

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS
FACULTAD DE MEDICINA



Universidad de Alcalá

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TAMOXIFENO, RALOXIFENO Y
TOREMIFENO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL
COLESTEROL. IMPACTO SOBRE EL TRANSPORTE REVERSO DE
COLESTEROL DESDE LOS MACRÓFAGOS.**

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor presentada por la Licenciada en Química

María Eugenia Fernández Suárez

Directores de la tesis:

Dr. Diego Gómez-Coronado Cáceres

Adjunto del Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal
e Investigador del CIBERobn

Dr. Javier Martínez-Botas Mateo

Investigador contratado del Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario
Ramón y Cajal y del CIBERobn

Este trabajo ha sido realizado en el

Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal

2014

D. Diego Gómez-Coronado Cáceres, Doctor en Ciencias Biológicas y Adjunto del Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal e investigador del CIBERobn y D. Javier Martínez-Botas Mateo, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador del Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal y del CIBERobn.

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por Dña. María Eugenia Fernández Suárez, Licenciada en Química por la Universidad de Alcalá, para optar al grado de Doctor, bajo el título “Estudio de los efectos del tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno sobre la regulación de la homeostasis del colesterol. Impacto sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos”, se ha realizado bajo nuestra dirección en el Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

Consideramos que el estudio experimental es original y los resultados tienen la suficiente calidad científica para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá.

Ha actuado como tutor y presenta su conformidad el Dr. Antonio Jiménez Ruiz, Catedrático de Universidad, Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá.

Dr. Diego Gómez-Coronado
Adjunto
Servicio de Bioquímica-
Investigación del Hospital
Universitario
Ramón y Cajal de Madrid;

Dr. Javier Martínez-Botas
Investigador Contratado
Servicio de Bioquímica-
Investigación del Hospital
Universitario
Ramón y Cajal de Madrid

Dr. Antonio Jiménez Ruiz
Catedrático de Universidad
Departamento de
Biología de Sistemas
Universidad de Alcalá

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida mediante los proyectos del Instituto de Salud Carlos III PI081063 y PI11/2077, de ayudas de la acción COST BM904 para la realización de *Short-Term Scientific Missions*, de una Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación del Instituto de Salud Carlos III, expediente FI06/00273, y de un contrato del CIBER, Área Temática de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), que es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

A mi madre, A Ernesto

A Armando, con todo mi cariño

Y, sobre todo, a mi hijo

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Diego Gómez-Coronado Cáceres, por dirigir este trabajo, por guiarme por las sendas de la ciencia como el Quijote a Sancho Panza por los caminos de La Mancha. Yo he aprendido, como fiel escudero, no solo técnicas bioquímicas sino, también, valores cada vez más difíciles de encontrar en nuestros días.

Al Dr. Javier Martínez-Botas Mateo, por codirigir esta tesis, por compartir conmigo sus amplísimos conocimientos de biología molecular y de técnicas solo asequibles a unos pocos, por confiar en mí.

Al Dr. Antonio Jiménez Ruiz, por su trabajo como tutor de esta tesis, y porque debido al privilegio de haber sido su alumna, admiro profundamente sus conocimientos y su forma de transmitirlos.

Al Dr. Miguel Ángel Lasunción Ripa, por ser un referente incuestionable como persona y profesional; por ser un faro que guía nuestras naos en noches de tormenta.

Al Dr. Joan Carles Escolà Gil por su amabilidad infinita y sus valiosas enseñanzas de los modelos animales. Al Dr. Francisco Blanco Vaca por su buena predisposición para aportar a este trabajo una dimensión *in-vivo*. A Josep, a Elena y sobre todo a David cuya ayuda y enseñanzas han sido vitales en la realización de este trabajo.

A Lorena y a Vero por su inestimable ayuda, comprensión y dedicación a lo largo de todo este trabajo. Al Dr. Alberto Dávalos, un colaborador excelente y un mejor amigo.

Al Dr. Oscar Pastor y a Gely por sus efectivas contribuciones a este estudio. A la Dra. Rebeca Busto y a la Dra. M^a Antonia Martín Hidalgo y a mis compañeros de laboratorio: Cova, Lidia A., Paquita, Jana, Sara, Aberto, M^a Emilia y Gema cuya colaboración y apoyo han sido fundamentales en este trabajo. A todos mis compañeros que de una forma u otra han formado parte de esta etapa de mi vida.

Al Dr. Carlos Correa por sus clases de experimentación animal y su ayuda en el animalario. Al Dr. Rafael Gonzalo-Gobernado (Rafa) por su paciencia y dedicación en las horas interminables de microscopía confocal. Al Dr. Carlos Paíno por sus consejos sobre cultivos celulares, inmunocitoquímica y microscopía. Al Dr. Luis Orenzan por sus contribuciones tanto científicas como culturales.

A mi madre, centro de mi universo durante casi toda mi existencia, espejo en el que mirarme, a quien quiero y admiro infinitamente. A mi padre, ejemplo de tenacidad, trabajo y esfuerzo, quien siempre ha estado para apoyarme en los momentos más duros y quien siempre veló por mí, independientemente de la distancia a la que nos encontrásemos. A Armando, mi segundo padre, por su ejemplo de honradez y rectitud, por la familia que me diste.

A mi suegra, cuya ayuda en el cuidado de mi nene ha sido fundamental para que yo pudiera realizar este trabajo, de quien siempre he recibido apoyo y cariño y por quien siento un profundo afecto.

A mi abuela, optimista inquebrantable, impermeable a cualquier temporal y a quien siempre tengo en mi corazón. A mis hermanos, tíos y primos todos. A mi tío Orlando, con quien me identifico mucho, quien me anima y apoya en mis sueños locos y emprendedores.

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga Marta, por las tardes de paseos, por los juegos de los niños, por sus ánimos e interés en la marcha de esta tesis. A mis amigos, y fotógrafos favoritos, Ascensión y Salvador a quienes debo la portada de esta tesis.

He querido dejar para el final, mi agradecimiento más especial a Ernesto, la otra mitad de mí, mi esposo, mi compañero de viaje, mi apoyo incondicional y a mi hijo, mi tesoro, la luz de mis ojos, mi esperanza renovada cada mañana, quienes han vivido esta tesis tanto como yo.

*“Soy feliz, soy un hombre feliz, y quiero que me perdonen,
por este día, los muertos de mi felicidad”*

Silvio Rodríguez

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
RESUMEN / SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. El colesterol	3
1.1. Descripción de la molécula	4
1.2. Funciones.....	4
1.3. Biosíntesis del colesterol	6
1.4. Síntesis de oxiesteroides	10
1.5. Transporte extracelular: Lipoproteínas	11
1.5.1. Quilomicrones.....	11
1.5.2. VLDL e IDL.....	12
1.5.3. LDL.....	12
1.5.3.1. LDL modificadas.....	13
1.5.4. HDL.....	14
1.5.5. Dislipemias.....	16
2. Captación celular de lipoproteínas.....	17
2.1. Receptor de LDL.....	18
2.2. Otros receptores de la familia del receptor de LDL.....	19
2.3. Receptores “scavenger”	20
3. Tráfico Intracelular de colesterol	21
3.1. Distribución intracelular de colesterol	21
3.2. Tráfico entre el retículo endoplásmico y la membrana plasmática	22
3.3. Transporte mitocondrial de colesterol.....	22
3.4. Salida del colesterol del endosoma tardío y lisosomas.....	23
4. Transporte reverso de colesterol	25
4.1. Exportación del colesterol celular	26
4.1.1. ABCA1.....	27
4.1.2. ABCG1 y ABCG4.....	29
4.1.3. ABCG5 y ABCG8.....	31
4.1.4. CLA-1/SR-BI.....	31
4.1.5. Apo E.....	32
4.2. Transporte de colesterol al hígado y excreción en heces	32

5. Regulación de la homeostasis del colesterol	35
5.1. SREBP-Scap-Insig	36
5.1.1. Papel de Insig en la degradación de la HMGCoAR controlada por esteroides.....	37
5.2. LXR.....	38
5.2.1. Regulación de la biosíntesis y captación celular de colesterol.....	39
5.2.2. Regulación del transporte reverso de colesterol.....	40
5.2.3. Regulación del metabolismo de ácidos biliares y la absorción intestinal del colesterol.	40
5.3. PPAR	41
5.4. MicroRNAs	42
6. Aterosclerosis. Papel del macrófago.....	43
7. Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos	45
7.1. Tamoxifeno	45
7.2. Toremifeno.....	47
7.3. Raloxifeno	47
7.4. El 27-hidroxicolesterol, un SERM endógeno.....	48
7.5. Mecanismo de acción mediante los receptores de estrógenos	49
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Materiales	57
2. Métodos.....	57
2.1. Cultivos celulares	57
2.1.1. Mantenimiento de las líneas celulares.....	57
2.1.2. Aislamiento de macrófagos primarios humanos y de ratón.....	58
2.2. Aislamiento de lipoproteínas y suero deficiente en lipoproteínas.....	58
2.3. Elaboración de complejos de colesterol y metil- β -ciclodextrina	59
2.4. Extracción de RNA y mRNA	59
2.5. Microarrays	60
2.5.1. Marcaje del mRNA e hibridación sobre el microarray.....	60
2.5.2. Análisis de los microarrays.....	61
2.6. Ensayos de exportación celular de colesterol.....	62

2.7.	Estudio del transporte reverso de colesterol desde los macrófagos en ratones	63
2.7.1.	Determinación de los lípidos plasmáticos, hepáticos y fecales.....	63
2.7.2.	Determinación del perfil de lipoproteínas por FPLC.....	64
2.8.	Análisis del catabolismo de las HDL en ratones	64
2.9.	Determinación de la capacidad de las HDL y el plasma de ratones para aceptar colesterol de los macrófagos	65
2.10.	Reacción de retrotranscripción y PCR en tiempo real.....	65
2.11.	Electroforesis e inmunodetección de proteínas (western blot).....	67
2.11.1.	Aislamiento de membranas celulares para western blot.....	68
2.12.	Determinación del contenido celular y la biosíntesis de colesterol.....	68
2.13.	Microscopía	69
2.14.	Análisis estadísticos	69
RESULTADOS	71
1.	Efecto de los SERM sobre la expresión génica en líneas celulares	73
1.1.	Análisis de los efectos de los SERM sobre la expresión génica en células MOLT-4 mediante microarrays.....	73
1.2.	Confirmación de los resultados del microarray mediante PCR en tiempo real en células MOLT-4.	79
1.3.	Análisis de los efectos de los SERM sobre la expresión génica en células HepG2 mediante microarrays	80
1.4.	Confirmación de los resultados del microarray mediante PCR en tiempo real en células HepG2.....	86
2.	Estudio de los mecanismos implicados en el efecto de los SERM sobre la expresión génica	87
2.1.	Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el procesamiento de SREBP-2.....	87
2.2.	Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el tráfico intracelular del colesterol lipoproteico	88
2.3.	Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión génica y el tráfico intracelular de colesterol en función de la fuente de colesterol exógeno	90
2.4.	Papel de los receptores de estrógenos en los efectos de los SERM	98
2.5.	Efecto de los SERM sobre la expresión génica en macrófagos THP-1 en presencia de LDL modificadas	101
3.	Efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol de los macrófagos	106
3.1.	Estudios en macrófagos THP-1	106

3.1.1. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el contenido y la síntesis de colesterol.....	106
3.1.2. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular de colesterol.....	107
3.1.3. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión de moléculas transportadoras de colesterol.....	108
3.1.4. Efecto del TAM sobre la exportación del colesterol celular.....	111
3.1.5. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la exportación celular del colesterol de la vía endosomal.....	112
3.2. Estudios en macrófagos primarios humanos.....	116
3.2.1. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular de colesterol.....	117
3.2.2. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión de moléculas transportadoras de colesterol	118
3.2.3. Efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol de la vía endosomal.....	119
3.3. Estudios en macrófagos peritoneales de ratón	121
3.3.1. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular de colesterol.....	122
3.3.2. Efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol celular	123
3.3.3. Papel de los receptores de estrógenos.....	123
4. Efecto del TAM y el RAL sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos en ratones.	126
4.1. Efecto del TAM y el RAL sobre los lípidos plasmáticos y hepáticos	126
4.2. Efecto del TAM y el RAL sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos.....	128
4.3. Efecto del TAM y el RAL sobre la composición, funcionalidad y aclaramiento de las HDL en ratones	129
4.4. Efecto del TAM y el RAL sobre la expresión hepática e intestinal de moléculas implicadas en el transporte reverso de colesterol	133
DISCUSIÓN.....	137
1. Efecto de los SERM sobre el tráfico intracelular de colesterol y la expresión de genes reguladores de la homeostasis celular del colesterol.....	139
2. Efecto de los SERM sobre la exportación de colesterol por el macrófago	145
3. Efecto del tamoxifeno y el raloxifeno sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos	147

CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA	159

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACAT-1	acil-CoA-colesterol aciltransferasa 1
apo	apolipoproteína
AEBS	<i>antiestrogen binding site</i>
apo ER2	<i>apo E receptor 2</i>
BSA	albúmina de suero bovino
cAMP	AMP cíclico
CETP	proteína transferidora de ésteres de colesterol
CK2	caseína quinasa
CoIMCD	complejos de colesterol y metilciclodextrina
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
E2	estradiol
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ER	receptores de estrógenos
ESR1	gen del receptor de estrógenos α
ESR2	gen del receptor de estrógenos β
ET/L	endosoma tardío/lisosoma
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HL	lipasa hepática
HMG-CoA	3 β -hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMGCoAR	HMG-CoA reductasa
HMGCR	Gen de la HMGCoAR
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSA	albúmina de suero humano
ICI	ICI 182,780
IDL	lipoproteínas de densidad intermedia
Idol	<i>inducible degrader of the LDL receptor</i>
Insig	<i>insulin-induced gene</i>
JAK2	quinasa janus 2
LCAT	lecitina-colesterol aciltransferasa
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LDL-Ac	LDL acetiladas
LDL-Ox	LDL oxidadas
LDLR	gen del rLDL
LOV	lovastatina
LPDS	suero deficiente en lipoproteínas
LPL	lipoproteína lipasa
LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
LXR	<i>liver X receptor</i>
LXRE	elementos de respuesta a LXR
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
miRNA	microRNA

ABREVIATURAS

MP	membrana plasmática
MPH	macrófagos primarios humanos
MPR	macrófagos peritoneales de ratón
MTP	proteína microsomal transferidora de triglicéridos
TAM-OH	4-hidroxitamoxifeno
ORP	<i>OSBP-related proteins</i>
OSBP	<i>oxysterol binding protein</i>
PBS	salino tamponado con fosfato
PCSK9	<i>proprotein convertase subtilisin-like kexin type 9</i>
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEST	secuencia rica en Pro, Glu, Ser y Thr
PI3K	fosfatidil-inositol 3-quinasa
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLTP	proteína transferidora de fosfolípidos
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RAL	raloxifeno
RE	retículo endoplásmico
rLDL	receptor de LDL
rVLDL	receptor de VLDL
RXR	receptor X de retinoides
SBF	suero bovino fetal
Scap	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
Scarb1	gen de SR-BI
SCP-2	<i>sterol carrier protein</i>
SERD	<i>selective estrogen receptor down-regulators</i>
SERM	moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
START	<i>StAR-related</i>
T0	T0901317
TAM	tamoxifeno
TGF-β	factor de crecimiento transformante β
TNF-α	factor de necrosis tumoral
TOR	toremifeno
TRC	transporte reverso de colesterol
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN / SUMMARY

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) constituyen un grupo diverso de compuestos con actividad agonista o antagonista de estrógenos. En relación con estas acciones, el tamoxifeno, el toremifeno y el raloxifeno han acaparado gran interés clínico para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, se conoce que estos fármacos poseen, además, un efecto hipocolesterolemizante, ya que reducen la concentración de LDL. En el caso del TAM se conoce que estimula la expresión del receptor de LDL y que este efecto es sinérgico con el de la lovastatina. Con estos antecedentes, nos propusimos estudiar los efectos del tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno sobre diversos aspectos de la regulación de la homeostasis del colesterol y, especialmente, el impacto sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos. Comenzamos nuestro estudio con un barrido de expresión génica mediante microarrays en células MOLT-4 y HepG2 tratadas con cada uno de los SERM y en combinación o no con lovastatina. Observamos que los tres SERM aumentaron la expresión de los genes diana de las proteínas que se unen a los elementos regulados por esteroides (SREBP), efecto que fue, además, sinérgico cuando cada uno de estos fármacos se combinó con la lovastatina. En consonancia con ello, los SERM aumentaron el procesamiento de SREBP-2. Comprobamos también en distintos modelos celulares que, al igual que se había descrito para el tamoxifeno en células MOLT-4, el raloxifeno y el toremifeno inhibían el tráfico intracelular del colesterol suministrado con LDL o, en el caso de los macrófagos, LDL acetiladas, produciendo un fenotipo compatible con la acumulación de colesterol libre en los endosomas tardíos/lisosomas. Esta inhibición del tráfico podía explicar el aumento del procesamiento de SREBP y la expresión de sus genes diana. Por otro lado, los SERM disminuyeron la expresión de genes diana de LXR, especialmente la de ABCA1 y ABCG1. De manera compatible con los efectos celulares de los SERM, estos inhibieron la exportación de [3 H]colesterol de los macrófagos tanto humanos como de ratón hacia la apolipoproteína A-I y, más levemente, hacia las HDL. En un modelo de ratón, el tratamiento oral con raloxifeno y, en mayor medida, con tamoxifeno disminuyeron la concentración de colesterol-HDL y alteraron la composición de estas partículas. Esto se asoció a sendos aumentos en el catabolismo de HDL-oleato de [3 H]colesterol y de la expresión hepática del receptor SR-BI. Además, dichos SERM disminuyeron la capacidad de las HDL para promover la exportación de [3 H]colesterol por los macrófagos. Finalmente, analizamos el efecto del tratamiento con estos SERM sobre el transporte reverso de colesterol desde macrófagos cargados con [3 H]colesterol e inyectados intraperitonealmente. El tamoxifeno, pero no el raloxifeno, disminuyó las cantidades de trazador en el suero, hígado y heces. Ambos fármacos, aunque en mayor medida el tamoxifeno, redujeron la expresión hepática de ABCG5 y ABCG8.

Podemos concluir que, mediante la inhibición del tráfico intracelular de colesterol, el tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno interfieren en los mecanismos reguladores de la homeostasis celular del colesterol. Más particularmente, los SERM reducen la exportación de colesterol por los macrófagos, especialmente la mediada por ABCA1. In vivo, el tamoxifeno y el raloxifeno reducen la concentración de colesterol-HDL en ratones mediante la aceleración de su catabolismo, a la vez que alteran la composición y funcionalidad de las HDL. Sin embargo, el tamoxifeno, pero no el raloxifeno, disminuye el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos, efecto probablemente debido a la inhibición de la salida del colesterol desde dichas células y, en menor grado, a la reducción de la excreción hepática mediada por ABCG5 y ABCG8.

SUMMARY

Selective estrogen receptor modulators (SERMs) are nonsteroidal molecules that display an estrogen-agonist or estrogen-antagonist effect depending on the tissue targeted. Owing to these actions, tamoxifen, toremifene and raloxifene have attracted great clinical interest for the treatment of several pathologies. However, it is known that these agents also display hypocholesterolemic effects, as they reduce the concentration of LDL. Particularly, TAM stimulates the expression of the LDL receptor and this effect is synergistic with that of lovastatin. With this background we aimed to study the effects of tamoxifen, raloxifene and toremifene on different aspects of the regulation of cholesterol homeostasis and, especially, their impact on reverse cholesterol transport from macrophages. We began our study with the analysis of the gene expression profiling by microarrays in MOLT-4 and HepG2 cells treated with each of the SERMs combined or not with lovastatin. We observed that the three SERMs increased the expression of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) target genes and that this effect was synergistic when each SERM was combined with lovastatin. In keeping with this, SERMs increased SREBP-2 processing. Additionally, we proved in different cell models that, as originally described for tamoxifen in MOLT-4 cells, raloxifene and toremifene also inhibit the intracellular trafficking of cholesterol supplied with LDL or, in the case of macrophages, acetylated LDL, thereby producing a phenotype compatible with free cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes. This inhibition could explain the SERM-induced increase of SREBP processing and the overexpression of SREBP target genes. On the other hand, SERMs decreased the expression of LXR target genes, especially that of ABCA1 and ABCG1. Consistently with their cellular effects, SERMs inhibited [³H]cholesterol efflux from both human and mouse macrophages to apolipoprotein A-I and, more slightly, to HDL. In a mouse model, oral treatment with raloxifene and, more strongly, with tamoxifen decreased the concentration of HDL-cholesterol and altered the composition of these particles. These effects were associated with increases in the catabolism of HDL-[³H]cholesterol-oleate and in the hepatic expression of the receptor SR-BI. Furthermore, the SERMs decreased the ability of HDL to promote [³H]cholesterol efflux from macrophages. Finally, we analyzed the effect of these SERMs on reverse cholesterol transport from macrophages loaded with [³H]cholesterol and injected intraperitoneally. Tamoxifen, but not raloxifene, decreased the amount of tracer in the serum, liver and feces. Both drugs, although more markedly tamoxifen than raloxifene, reduced the hepatic expression of ABCG5 and ABCG8.

We conclude that, by inhibiting intracellular cholesterol trafficking, tamoxifen, raloxifene and toremifene interfere with the regulatory mechanisms controlling cellular cholesterol homeostasis. More particularly, SERMs reduce cholesterol efflux from macrophages, especially that mediated by ABCA1. In vivo, tamoxifen and raloxifene reduce the concentration of HDL cholesterol in mice by accelerating its catabolism, while they alter HDL composition and functionality. However, tamoxifen, but not raloxifene, lowers macrophage-specific reverse cholesterol transport, an effect that is likely due to the inhibition of cholesterol efflux from these cells and, to a lesser extent, to the reduction of the hepatic excretion mediated by ABCG5 and ABCG8.

INTRODUCCIÓN

1. El colesterol

El colesterol es una molécula que cumple distintas funciones fisiológicas esenciales para la vida animal. El contenido celular de colesterol está finamente regulado por diversos y complejos mecanismos. Su gran importancia se pone de manifiesto en las consecuencias del desequilibrio en la homeostasis del mismo. Así, el exceso de colesterol aumenta el riesgo de padecer aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, primera causa de muerte en países desarrollados, y su defecto se traduce en malformaciones congénitas, retraso mental y, en algunos casos, muerte a edades tempranas [1].

El colesterol fue descubierto en el año 1815 por el químico francés M. E. Chevreul, quien lo aisló de cálculos de la vesícula biliar y lo denominó colestérina (del griego *chole*, bilis y *stereos*, sólido). Su estructura fue descrita, aunque no correctamente, por A. Windaus y H. Wieland en 1926. Este trabajo, junto con la identificación de la estructura del ácido cólico, le valió a H. Wieland el premio Nobel de Química en 1927. No fue hasta 1932 que el propio Wieland en colaboración con E. Dane descifró la estructura exacta del colesterol. Poco tiempo después, se inició el estudio del origen biosintético del colesterol, siendo cruciales en este campo los estudios de R. Schoenheimer, D. Rittenberg, G. Popjak, J. Conforth y, sobre todo, K. Bloch, que culminaron con la descripción de todas las reacciones enzimáticas, más de treinta, necesarias para la formación, a partir de acetato, del ergosterol en hongos y del colesterol en animales [1]. Estos hallazgos y muchos otros de gran valor en este campo le fueron reconocidos a Bloch al concedérsele en 1964 el premio Nobel de Medicina y Fisiología [2].

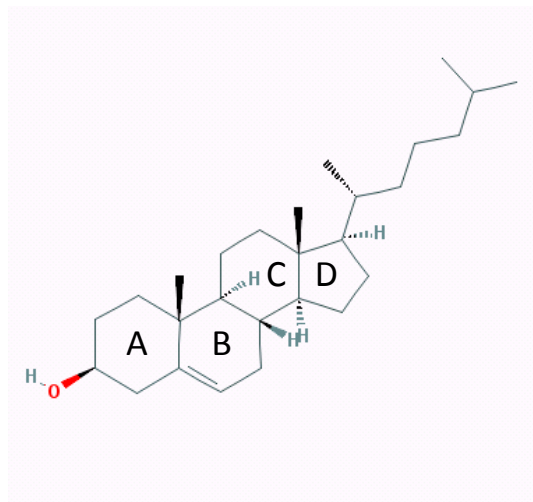
Por otra parte, varios investigadores realizaron brillantes descubrimientos acerca del papel del colesterol en la fisiología y su relación con distintas patologías. Uno de ellos fue el realizado por el patólogo alemán A. Windaus que en 1910 observó que en las lesiones ateromatosas había un contenido mucho mayor de colesterol que en una pared arterial normal [3]. Partiendo de este y otros antecedentes el científico ruso N. Anichkov y colaboradores, en 1913, alimentando a conejos con diferentes dietas, descubrieron que solo aquellos a los que se les suministraba colesterol desarrollaban aterosclerosis [3]. El reconocimiento de Anichkov no llegó, sin embargo, hasta que JW. Gofman en 1950, reproduciendo los experimentos de este, obtuvo del suero de los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol, por ultracentrifugación, dos fracciones de diferente densidad. Gofman denominó a una de estas fracciones lipoproteínas de baja densidad, que relacionó con la aterosclerosis, y a la otra fracción, lipoproteínas de alta densidad [3, 4].

Otro importante hito en el campo del colesterol fue el descubrimiento, por J. L. Goldstein y M. S. Brown, del receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL), cuyo estudio ha permitido el avance en el conocimiento no solo de la utilización de las lipoproteínas por las células sino también del proceso de la endocitosis en general [5]. Las deficiencias de este receptor son la causa de la hipercolesterolemia familiar, una de las enfermedades congénitas monogénicas más frecuentes y que se asocia a un elevado riesgo cardiovascular por la acelerada aterosclerosis que conlleva. Los trabajos de dichos autores mostraron también los efectos del colesterol sobre la regulación del propio rLDL y de diferentes enzimas de la ruta de colesterologénesis. Estas contribuciones fueron reconocidas con la concesión del Nobel de Medicina y Fisiología en 1985 [6]. Posteriormente, Goldstein y Brown descubrieron los factores de transcripción SREBP y

describieron el papel esencial del retículo endoplásmico en la detección y regulación del contenido celular de colesterol [7].

1.1. Descripción de la molécula

El colesterol pertenece al grupo de los esteroides que, a su vez, forman parte de la gran familia de los lípidos isoprenoides por derivar en su biosíntesis del isopentenil pirofosfato. La estructura de los esteroides está compuesta por un anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, un grupo alcohol en C3 y una cadena lateral alifática. Ello les confiere una estructura rígida con una conformación espacial esencialmente plana. El colesterol, concretamente, consta de 27 átomos de C, con una cadena lateral de 8 C, saturada y ramificada (Esquema 1).



Esquema 1. Estructura del colesterol

Los distintos seres vivos sintetizan sus propios esteroides. El colesterol es típicamente animal. Las plantas sintetizan los llamados esteroides vegetales o fitosteroides, como el β -sitosterol, el campesterol, el estigmasterol, el brasicasterol, etc.; excepcionalmente, algunas plantas sintetizan también colesterol en pequeñas proporciones [1]. Los hongos y levaduras sintetizan ergosterol (micosterol). Todos estos esteroides presentan grandes analogías entre sí; las pequeñas diferencias se encuentran en la cadena lateral y, en algunos casos, en la presencia de un doble enlace adicional en el anillo B del esterano. El grupo alcohol de los esteroides les permite esterificarse con un ácido graso, dando lugar a los ésteres de esteroides (estéridos), muy insolubles [1].

1.2. Funciones

El colesterol es uno de los constituyentes fundamentales de las membranas de las células animales, a las que confiere unas propiedades de fluidez y permeabilidad específicas. Se presenta en forma de colesterol no esterificado (libre) y en cantidad proporcional, con márgenes muy estrechos, a los fosfolípidos [8]. El colesterol es la molécula unitaria más abundante de la membrana plasmática (MP), superando a la fosfatidilcolina. Su concentración en las membranas varía de unas células a otras. En las membranas intracelulares su presencia es menor, aunque variable de unas a otras, destacando la membrana del retículo endoplásmico (RE) como la más pobre en dicha molécula.

En ciertas regiones de la MP se forman estructuras ricas en colesterol y glicoesfingolípidos que son experimentalmente resistentes a la extracción por detergentes en frío (*detergent-resistant membrane* o *DRM*) y a las que se ha llamado balsas lipídicas (*lipid rafts*) o, en el caso de poseer caveolina, caveolas [9]. Estas balsas tienen estructura fluida, pero más ordenada y empaquetada que la de las regiones adyacentes debido al mayor grado de saturación de los

ácidos grasos de aquéllas. En ellas se localizan proteínas transmembrana o proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol que están implicados en funciones como la endocitosis, la señalización celular y el transporte intracelular [10, 11]. De hecho, diversas patologías parecen deberse a alteraciones en dichas estructuras, presumiblemente debidas a alteraciones en el contenido de colesterol. Por ejemplo, se ha descrito que el contenido de colesterol en la membrana puede afectar la estabilidad de las balsas lipídicas y, con ella, la accesibilidad de determinadas secretasas a la proteína precursora del péptido amiloide β (APP: *A β precursor protein*), regulando así la producción de este péptido, implicado en la enfermedad de Alzheimer [12].

Continuando con la función del colesterol en las membranas y el sistema nervioso, este lípido es indispensable en la formación y estabilidad de las sinapsis neuronales. Las neuronas del sistema nervioso central son capaces de producir suficiente colesterol para sobrevivir, pero la sinaptogénesis requiere cantidades adicionales de colesterol que son aportadas por la glía [13-15]. De hecho, mientras se desconocía su identidad, fue llamado factor glial. En ese mismo sentido, estudios de nuestro laboratorio, han demostrado que el colesterol es necesario para la formación de neuritas [16]. Esto sugiere que el colesterol tiene un papel clave en la diferenciación y la comunicación neuronales.

El colesterol también es esencial en la embriogénesis. Cuando los miembros de la familia de proteínas de secreción Hedgehog interactúan con sus receptores de membrana Patched, controlan la morfogénesis y la proliferación en el embrión [17]. Patched se encuentra inhibiendo la actividad de Smoothened, un regulador positivo de la activación de la vía de Hedgehog. El colesterol, mediante la formación de un aducto con Hedgehog, facilita la interacción con Patched, liberando la inhibición sobre Smoothened [17]. Es interesante señalar que tanto las alteraciones de estas proteínas como las alteraciones en la formación de esteroides conducen a graves alteraciones en la embriogénesis [18].

Por otra parte, es bien conocido el papel del colesterol como precursor metabólico en la biosíntesis de los ácidos y sales biliares. Estos compuestos se sintetizan en los hepatocitos, por hidroxilación del anillo de esterano y pérdida parcial de la cadena lateral del colesterol. La formación de las sales biliares se considera una vía de degradación, aunque parcial, del colesterol en sí misma, pero, a su vez, estos compuestos, junto con fosfolípidos, solubilizan el colesterol en la bilis facilitando su excreción. Además, su acción solubilizadora de lípidos en la luz intestinal es clave para la asimilación de los lípidos de la dieta y de las vitaminas liposolubles [1].

El colesterol, además, puede ser convertido en hormonas esteroídicas. La esteroidogénesis tiene lugar en células especializadas de órganos como la glándula adrenal, el ovario, el testículo o la placenta y transcurre con pérdida de la cadena lateral y pequeños cambios en el anillo de esterano [1]. Estas hormonas regulan procesos tan variados como la diferenciación sexual, la reproducción, la fertilidad, el metabolismo de los carbohidratos y el catabolismo de las proteínas, entre otros.

Por último, el colesterol juega un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular, participando no solo como unidad para la formación de membranas sino como molécula reguladora del ciclo celular. De hecho, estudios de nuestro grupo han demostrado que el colesterol controla la progresión a lo largo de las fases G2 y M del ciclo celular y que el

mevalonato o sus derivados isoprenoides no esteroídicos son necesarios para el paso de G1 a S [19, 20]. En las células, el papel estructural puede ser ejercido por una gran variedad de esteroides, pero el papel regulador está restringido al esteroide característico de cada especie. No obstante, es pertinente indicar en este punto que en células animales el desmosterol, precursor inmediato del colesterol, es capaz de sustituir completamente a éste para la proliferación celular [21, 22]. Por otro lado, la inhibición distal de la ruta de síntesis de colesterol puede activar mecanismos de diferenciación celular, lo que podría ser utilizado para el estudio y tratamiento del cáncer [23].

1.3. Biosíntesis del colesterol

Como acabamos de relatar, el colesterol es una molécula que tiene un papel esencial en las células animales. En concordancia con ello, todas las células de nuestro organismo pueden no solo captar colesterol exógeno sino también sintetizarlo en un proceso llamado colesterogénesis. Este proceso implica más de treinta enzimas que se localizan en el citoplasma, el RE y los peroxisomas [1]. La síntesis *de novo* de colesterol se realiza en varias etapas, en las que, además de colesterol, se sintetizan otros compuestos, algunos de carácter no esteroídico y otros de naturaleza esteroídica, que son indispensables para determinadas funciones celulares.

La primera etapa de la ruta es la síntesis de mevalonato, un compuesto de seis carbonos, a partir del acetil-CoA (Esquema 2a). La última reacción de esta etapa, la conversión de 3 β -hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, está catalizada por la HMG-CoA reductasa (HMGCoAR), enzima localizada en el RE, y que es, precisamente, el paso limitante de la biosíntesis de colesterol. Ello explica que dicha enzima esté finamente regulada a distintos niveles [24] y que sea, por tanto, una importante diana terapéutica para el control de la hipercolesterolemia. Los inhibidores más conocidos y utilizados de esta enzima son las estatinas, que reducen de manera muy efectiva la concentración plasmática de colesterol. Entre las utilizadas en la clínica se encuentran la lovastatina, la pravastatina y la simvastatina, que son sintetizadas por hongos, y la fluvastatina, la atorvastatina y la rosuvastatina que son completamente sintéticas [25, 26].

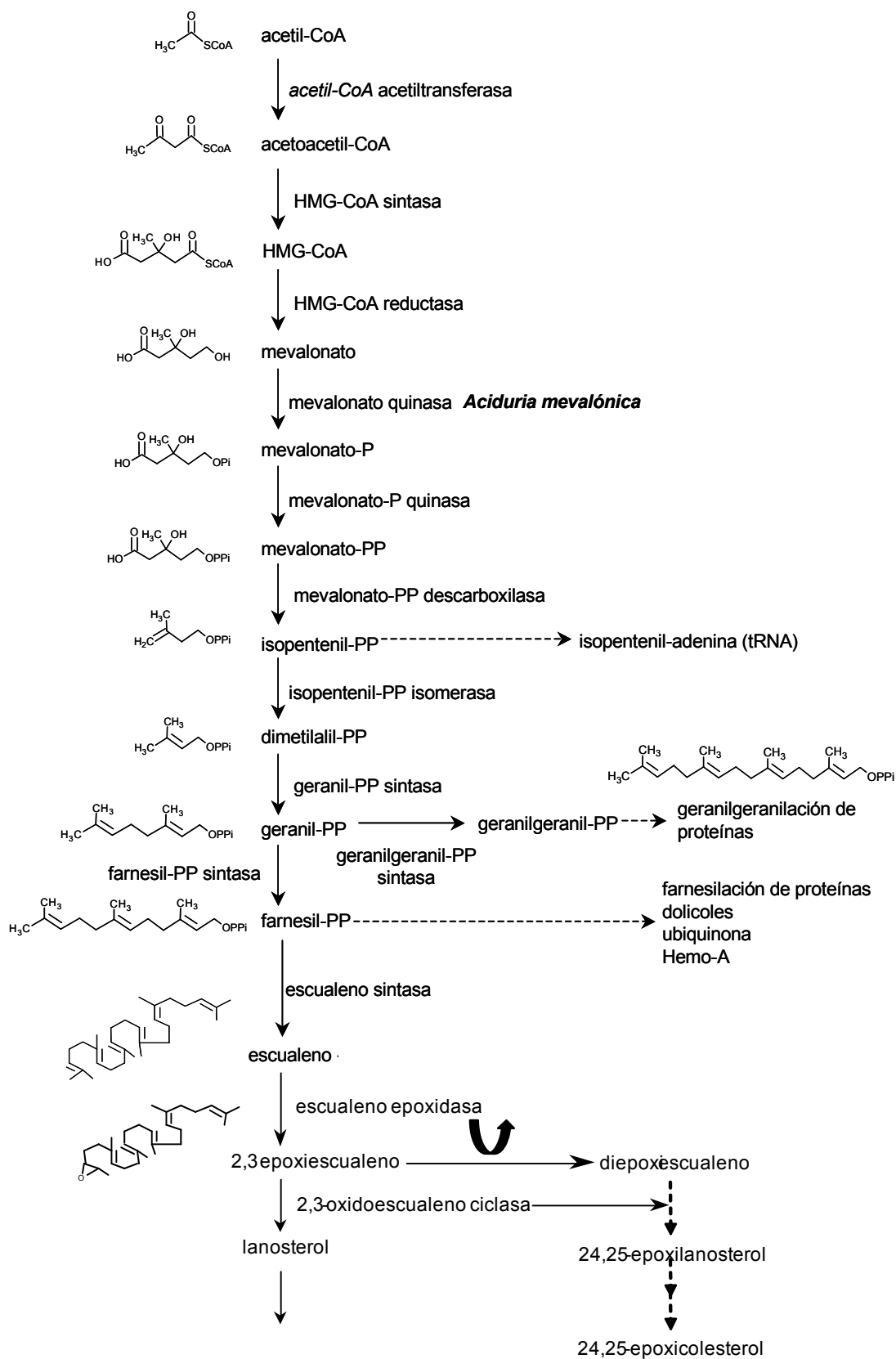
La siguiente etapa es la formación del isopentenil 3-pirofosfato (IPP), unidad básica para la síntesis de isoprenoides, previa pérdida de un carbono. Seis de aquellas unidades se condensan sucesivamente para formar el escualeno, el cual, a su vez, da origen al primer esteroide de la ruta, el lanosterol (Esquema 2a). Distintos intermediarios previos al escualeno tienen gran importancia para diferentes procesos fisiológicos. Es el caso del IPP, que se emplea para la síntesis de isopentenil adenina, compuesto que forma parte de algunos tRNA [27, 28]. El farnesil pirofosfato puede utilizarse para la síntesis del grupo hemo A (grupo prostético de los citocromos), los dolicololes (transportadores de oligosacáridos para la N-glicosilación de proteínas) y las ubiquinonas (poliprenoles con acción antioxidante y que participan también en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria) [1]. Además, el farnesil pirofosfato y el geranilgeranil pirofosfato, que procede del anterior, pueden unirse covalentemente a determinadas proteínas como Rho, Ras, proteínas G pequeñas, laminas nucleares etc., y esta modificación postraducciona (prenilación) permite que las mismas se localicen en las membranas donde participan en la señalización celular, el tráfico vesicular, la proliferación y la diferenciación celular [29-31].

Para la síntesis de lanosterol, el escualeno debe ciclarse, para lo cual se requiere la incorporación previa de una molécula de oxígeno (Esquema 2a). El colesterol se forma a partir del lanosterol tras numerosas reacciones que incluyen, esencialmente, la pérdida de tres grupos metilo, la reubicación de un doble enlace en el anillo B y la reducción del doble enlace en C24-25. Estas reacciones pueden llevarse a cabo por dos vías diferentes, la vía insaturada (vía de Bloch), en la que todos los esteroides intermediarios poseen el doble enlace en C24-25 y cuyo último compuesto, el desmosterol, se transforma finalmente en colesterol gracias a la acción de la 3β -hidroxiestero Δ^{24} -reductasa (Esquema 2b), y la vía saturada (vía de Kandustch-Russell), en la que dicha reducción se produce previamente y el precursor inmediato del colesterol es el 7-deshidrocolesterol [32, 33]. De hecho, la 3β -hidroxiestero Δ^{24} -reductasa puede actuar sobre los distintos intermediarios insaturados en C24-25, pudiendo así conectarse ambas vías en distintos puntos a partir del lanosterol [1].

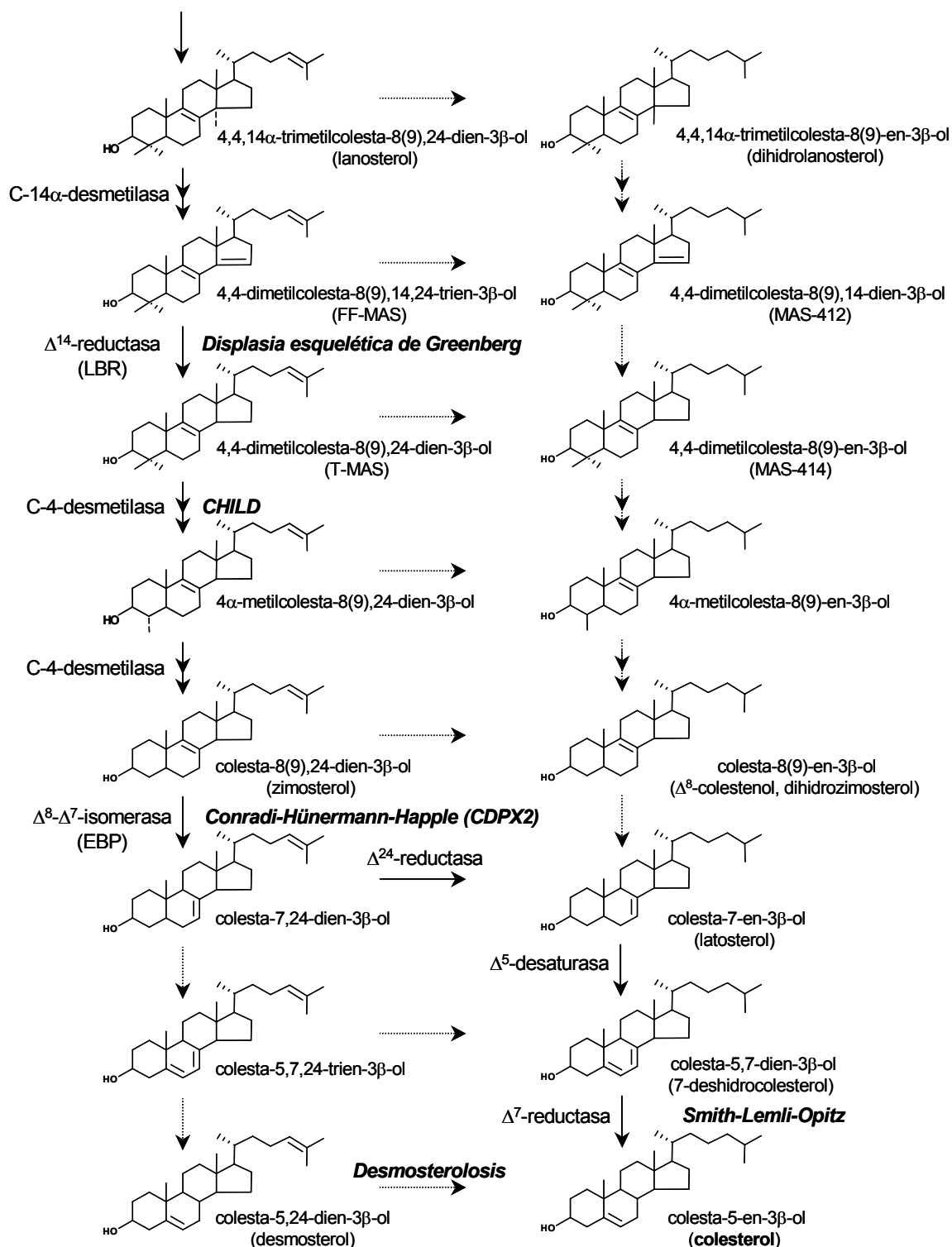
Determinados esteroides intermediarios poseen otras funciones. Así, el 7-deshidrocolesterol es precursor de la vitamina D3. El 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trien-3-ol, también llamado FF-MAS (*folicular meiosis activating sterol*) y el 4,4-dimethylcolesta-8,14-dien-3-ol, conocido como T-MAS (*testicule meiosis activating sterol*), estimulan la reanudación de la meiosis en oocitos y en espermatozoides respectivamente [34, 35].

Existe, además, una ramificación de la vía, a nivel del 2,3-epoxiesqualeno, por la que se obtiene el 24,25-epoxicolesterol, compuesto que cumple importantes funciones reguladoras, como veremos más adelante. El origen de este compuesto está en la acción de la escualeno epoxidasa sobre el 2,3-epoxiesqualeno, para dar diepoxiesqualeno, que es preferentemente ciclado por la oxidoescualeno ciclasa a 24,25-epoxilanoesterol. Este último continúa la ruta de síntesis, catalizada por las mismas enzimas que en la síntesis de colesterol, excepto la 3β -hidroxiestero Δ^{24} -reductasa, hasta dar el 24,25-epoxicolesterol [1].

La principal forma de regulación de la biosíntesis de colesterol es la retroregulación a cargo del producto final, pero ni el colesterol es el único regulador, ni la regulación se ejerce sobre una sola enzima. De hecho, se conoce que la expresión de prácticamente todas las enzimas de esta vía es reprimida por el colesterol, y algunas también por el farnesol, oxisteroides y otros esteroides [1]. La transcripción de estas enzimas y de otras relacionadas con el metabolismo lipídico está controlada por los factores de transcripción SREBP de los que hablaremos más adelante (apartado 5.1).



Esquema 2a. Ruta de biosíntesis de colesterol: de acetil-CoA a lanosterol. En letra negra y cursiva aparecen las principales enfermedades asociadas a defectos en las enzimas correspondientes.



Esquema 2b. Ruta de biosíntesis de colesterol: de escualeno a colesterol. En letra negra y cursiva aparecen las principales enfermedades asociadas a defectos en las enzimas correspondientes.

La importancia de esta ruta metabólica se hace más patente si tenemos en cuenta las enfermedades congénitas debidas a defectos en ciertas enzimas de la vía que se asocian con una síntesis deficitaria de colesterol y la acumulación de distintos compuestos intermediarios (Esquemas 2a y 2b). Algunas de estas enfermedades son: la aciduria mevalónica y las fiebres periódicas de tipo Dutch, causadas por la deficiencia de la mevalonato quinasa, aunque con diferentes grados de gravedad; el síndrome de Smith-Lemli-Opitz, de transmisión autosómica recesiva, que está causado por la deficiencia en la esterol Δ^7 -reductasa; el síndrome de Hünemann-Happle y el síndrome CHILD (*congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythrodermia and limb defects*), que son defectos de tipo dominante ligados al cromosoma X que producen letalidad en los varones y están causados por deficiencias en la esterol $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y en la esterol C-4 desmetilasa, respectivamente; por último, dos enfermedades extremadamente raras de transmisión autosómica recesiva, como la desmosterolosis y la displasia esquelética de Greenberg, la primera debida a una deficiencia en la esterol Δ^{24} -reductasa y la segunda presumiblemente en la esterol Δ^{14} -reductasa. Todas ellas se caracterizan por producir importantes malformaciones, anomalías congénitas múltiples, retraso mental y del desarrollo y/o alteraciones cutáneas y esqueléticas, lo que indica la importancia del colesterol en la morfogénesis y el desarrollo embrionario [1].

1.4. Síntesis de oxisteroles

Los oxisteroles son estructuralmente idénticos al colesterol, pero con uno o más grupos funcionales que contienen oxígeno (como grupos alcohol, carbonilo o epóxido) [36]. Estas moléculas se caracterizan por tener diversos efectos biológicos, entre los que destacan sus potentes acciones reguladoras. Excepto el 24,25-epoxicoolesterol, los oxisteroles derivan del colesterol por varias vías, aunque en general se clasifican en dos grandes categorías: aquellos oxigenados en los anillos de esterol y aquellos oxigenados en la cadena lateral [36]. Generalmente los esteroides oxigenados en los anillos tienden a ser formados por vías no enzimáticas, mientras que los esteroides oxidados en la cadena lateral usualmente tienen un origen enzimático. Sin embargo, esta regla tiene excepciones, ya que el 25-hidroxicolesterol y el 7 α -hidroxicolesterol pueden ser sintetizados tanto por vía enzimática como no enzimática [36].

Las reacciones no enzimáticas ocurren por el ataque directo de radicales de especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre el colesterol. Esta reacción se produce fundamentalmente en la posición 7, que se localiza en el anillo B, y tiene como productos el 7 α/β -hidroperoxicoolesterol, el 7-cetocolesterol y el 7 α/β -hidroxicolesterol. Los oxisteroles de origen no enzimático más abundantes en la mayoría de los tejidos son el 7 α/β -hidroxicolesterol y el 7-cetocolesterol [36, 37].

La hidroxilación enzimática de la cadena lateral del colesterol puede dar 24-, 25- y 27-hidroxicolesterol; cada oxisterol está generado por diferentes enzimas [38]. La esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1) es una enzima P450 mitocondrial que se expresa en muchos tejidos, siendo particularmente abundante en el hígado y los macrófagos. Esta enzima cataliza el primer paso de la vía alternativa de síntesis de ácidos biliares. Cataliza la adición de un grupo hidroxilo en el C-27 del colesterol y también de esteroides relacionados, para dar esteroides 27-hidroxilados, entre los cuales destaca el 27-hidroxicolesterol, el oxisterol más abundante en el plasma [36]. La deficiencia de esta enzima es causa de la xantomatosis cerebrotendinosa. La colesterol 24-

hidroxilasa (CYP46A1) es también una enzima P450 que se localiza en el RE [39] y que se expresa principalmente en células neurales del cerebro y la retina [40, 41]. El cerebro es la principal fuente del 24-hidroxicolesterol circulante [40]. La colesterol 25-hidroxilasa es una enzima que no contiene el grupo hemo y se encuentra a bajas concentraciones en la mayoría de los tejidos, y se localiza en las membranas del RE y el aparato de Golgi [36]. Su producto, el 25-hidroxicolesterol, es un activo regulador de la vía de los SREBP (ver apartado 5.1) [38].

El 24,25-epoxicoolesterol, cuya síntesis ya se ha comentado, actúa como sensor de la acumulación de colesterol endógeno [36]. Así, se ha observado que la síntesis de 24,25-epoxicoolesterol se correlaciona con la del colesterol, aún en condiciones en las que ésta está alterada [42]. Ello repercute sobre la homeostasis celular del colesterol, ya que dicho oxiesterol es un potente agonista de LXR (ver apartado 5.2) [43, 44].

1.5. Transporte extracelular: Lipoproteínas

El colesterol utilizado por las células animales proviene tanto de la colesterogénesis como de fuentes exógenas que llegan a aquellas a través de la circulación sanguínea. El carácter apolar de los lípidos hace que su transporte en el plasma tenga características especiales. Salvo los ácidos grasos libres, que se unen a la albúmina, el resto de lípidos circulan asociados entre ellos y con ciertas proteínas (apolipoproteínas) para formar un complejo multimolecular hidrosoluble llamado lipoproteína. La superficie de la partícula lipoprotéica está compuesta por apolipoproteínas y una monocapa de fosfolípidos y colesterol libre que interaccionan con aquéllas. En esta superficie anfipática, los lípidos se orientan de manera que el exterior de la partícula es hidrofílico, lo que la hace soluble en el plasma, y el interior es hidrofóbico. En el núcleo de la lipoproteína se alojan los lípidos apolares, como triglicéridos, ésteres de colesterol y pequeñas cantidades de otros compuestos como las vitaminas liposolubles: acetato de retinol, tocoferol y carotenoides. La misión de las lipoproteínas es transportar estos lípidos entre los diferentes tejidos [45]. Estas partículas forman un conjunto extenso y variado de partículas de composición, tamaño y densidad diversa. Esta última propiedad se ha tomado para dividir las en cinco grandes grupos: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) [45].

1.5.1. Quilomicrones

Constituyen las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad ($d < 0,95$ kg/l). Son sintetizadas en los enterocitos a partir de los lípidos de la dieta y liberadas a la linfa mesentérica, desde donde pasan al torrente sanguíneo. Su apolipoproteína (apo) constitutiva es la apo B-48, que resulta de la “edición” del transcrito de la apo B-100 dando lugar a una proteína de menor tamaño (48 % del de la apo B-100); pero también contienen otras apolipoproteínas (A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E). El ensamblaje de apo B con los lípidos es un proceso complejo que ocurre en la luz del RE. El polipéptido de la apo B, conforme surge del polisoma en el que se está sintetizando, penetra en el RE y allí se asocia con triglicéridos y otros lípidos por acción de la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP), para dar lugar a la partícula precursora, la cual incrementa su tamaño al asociarse con una partícula lipídica carente de apo B [46]. Las partículas nacientes así formadas están compuestas, fundamentalmente, por

triglicéridos (más del 90 % de su masa) y pequeñas cantidades de ésteres de colesterol, fosfolípidos, vitaminas liposolubles y apolipoproteínas. Su función es transportar los ácidos grasos de la dieta a los diferentes tejidos; para ello, los triglicéridos son hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL), que está fijada al endotelio vascular y que es activada por la apo C-II contenida en el quilomicrón. Otra apolipoproteína con un papel importante en la activación de esta lipólisis es la apo A-V [47]. Los ácidos grasos resultantes pueden ser captados por las células de los tejidos subyacentes, y en el proceso la LPL puede, a su vez, desprenderse del endotelio y permanecer asociada a la lipoproteína, con la que viaja hasta el hígado para su degradación. La pérdida de triglicéridos distorsiona estructuralmente al quilomicrón que, en consecuencia, desprende componentes de su superficie tales como fosfolípidos, apo A-IV y apo C, transformándose en una partícula de menor tamaño o “remanente”. Por otra parte, tanto el quilomicrón naciente como el remanente pueden intercambiar triglicéridos por ésteres de colesterol provenientes de las HDL, en un proceso mediado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Finalmente, la lipoproteína resultante, relativamente rica en ésteres de colesterol y apo E, es extraída de la circulación por el hígado a través de los receptores de LDL y LRP, que reconocen la apo E, y propician la captación de la partícula por endocitosis. El tiempo de residencia de los quilomicrones en el plasma es de unos 10 minutos y el máximo de su concentración se observa de las 2 a 4 h tras la ingesta, mientras que en ayunas no se detectan en el plasma, salvo patología [46].

1.5.2. VLDL e IDL

Después de los quilomicrones, las VLDL son las partículas menos densas ($d < 1,006$ kg/l) y en estado posabsortivo son la mayor fuente de triglicéridos, en este caso endógenos, para los tejidos periféricos. Se forman en el hígado a partir de lípidos sintetizados *de novo* y de los que le llegan de la circulación y su apolipoproteína fundamental es la apo B-100. Al igual que para los quilomicrones, la apo B se ensambla con los lípidos con ayuda de la MTP. Las partículas nacientes son, así mismo, ricas en triglicéridos, aunque también transportan fosfolípidos y colesterol libre y esterificado. Una vez en el plasma, reciben colesterol y apolipoproteínas C y E de las HDL. Sus triglicéridos también pueden ser intercambiados con las HDL por ésteres de colesterol con la mediación de la CETP, pero en su mayor parte son hidrolizados por la LPL, con las consiguientes remodelaciones de la partícula, semejantes a las que sufren los quilomicrones. La lipoproteína resultante es así más pequeña y proporcionalmente más rica en colesterol que la VLDL inicial, pudiendo adquirir una densidad intermedia ($d = 1,06-1,019$ kg/l) entre la de las VLDL y las LDL, por lo que se les ha denominado IDL. Éstas pueden ser captadas y degradadas por el hígado a través del rLDL, que reconoce tanto la apo B-100 como la apo E, o sufrir la hidrólisis de parte de sus triglicéridos, catalizada por la lipasa hepática (HL), dando como producto una lipoproteína especialmente rica en colesterol, la LDL. El tiempo de residencia en el plasma de las VLDL es de 2 a 4 h [46].

1.5.3. LDL

Las LDL constituyen, además del producto del catabolismo de las VLDL, una reserva circulante de colesterol para los diferentes tejidos, siendo captadas preferentemente mediante el rLDL y degradadas en el interior celular. Se asemejan a sus precursoras en la apolipoproteína fundamental, la apo B-100, y se diferencian de éstas en que son esencialmente ricas en

colesterol, muy pobres en las apolipoproteínas C y E y tienen mayor densidad ($d=1,019-1,063$ kg/l). El hígado es el principal destino de las LDL, y da cuenta de la captación de aproximadamente el 70 % del total, aunque son las glándulas esteroideogénicas las que más LDL captan por unidad de masa. Estas lipoproteínas tienen mayor tiempo de residencia en el plasma (2 a 3 días) que sus precursoras. Su concentración viene determinada por la tasa de producción de VLDL, por un lado, y la tasa de catabolismo de VLDL, IDL y LDL, por otro. La hipercolesterolemia, por acumulación de LDL, es una de las consecuencias del desequilibrio entre ambos procesos [46].

1.5.3.1. LDL modificadas

Varias evidencias indican que las LDL pueden presentar, en el plasma, cierto grado de oxidación, el cual está limitado por la abundancia de antioxidantes tales como tocoferol, ascorbato, urato y albúmina [48, 49]. Sin embargo, el grueso de la oxidación de LDL tiene lugar en el espacio subendotelial de la pared vascular, donde las LDL pueden infiltrarse y ser retenidas por proteoglicanos, y donde la concentración relativa de antioxidantes es mucho menor que en el plasma. Las células de la pared arterial generan tanto radicales libres como oxidantes distintos de radicales, a través de varios mecanismos enzimáticos y como consecuencia del metabolismo de aquéllas [48]. En este ambiente las LDL se oxidan y agregan, con lo que adquieren propiedades aterogénicas y contribuyen al desarrollo de la lesión aterosclerótica [50]. Estas propiedades aterogénicas se pueden resumir en: formación de células cargadas con colesterol (espumosas), citotoxicidad (fundamentalmente por los oxisteroles que contiene) e inducción de un proceso inflamatorio [49]. Además de las células endoteliales, se ha comprobado que otros tipos celulares como las células del músculo liso, los macrófagos, los neutrófilos, las plaquetas o los linfocitos también son capaces de modificar oxidativamente a las LDL, por lo que este proceso puede tener lugar en los sitios donde se produce una reacción inflamatoria [49].

Con su oxidación, la partícula experimenta importantes modificaciones que alteran su metabolismo. El inicio de todos estos cambios es la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, los triglicéridos y el colesterol esterificado de la LDL, con lo cual se provoca una serie de reacciones oxidativas en cascada que acaban afectando la integridad estructural de la apo B [49]. Las LDL oxidadas (LDL-Ox) no constituyen una entidad de composición precisa, ya que ésta puede ser distinta en función del grado de oxidación. Para su clasificación pueden mencionarse dos grandes grupos: las LDL mínimamente modificadas, que aún son reconocidas por el rLDL y no son reconocidas por los receptores *scavenger* (ver más abajo), y las extensamente oxidadas, cuya apo B ha sido modificada hasta tal punto que ya no es reconocida por rLDL y sí lo es por los receptores *scavenger* [48]. Se cree que *in vivo*, las LDL extensamente oxidadas podrían tener una vida media muy corta ya que serían rápidamente captadas por las células del sistema reticuloendotelial. Sin embargo, en el plasma de individuos normales es posible detectar pequeñas cantidades de LDL mínimamente modificadas, cuya concentración aumenta en pacientes con enfermedad coronaria, diabetes y enfermedad renal [48]. Aunque, *in vitro*, las LDL extensamente oxidadas son las que inducen la acumulación de colesterol en los macrófagos (ver apartado 6), las formas de LDL con bajos grados de oxidación son las que presentan un mayor potencial en la inducción de respuesta inflamatoria, ya que tienen una gran capacidad para inducir el reclutamiento de monocitos a través de la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas por parte de las células endoteliales [49].

Aunque la oxidación es la modificación más estudiada de las LDL, existen otras que también pueden ser importantes en el inicio y progresión de la aterosclerosis. Entre ellas se cuentan la glicación no enzimática, la desialización, la electronegatividad, la agregación, la formación de complejos con proteoglicanos o algunos tipos de modificación inducidos por diversas enzimas lipolíticas [49].

La mayoría de las modificaciones determinan que las LDL no puedan ser reconocidas por el rLDL, siendo los receptores *scavenger* los encargados de captarlas. Esta captación no está regulada por la concentración de colesterol, lo cual, unido a la inducción de la inflamación provocada por dichas lipoproteínas, les confiere a las LDL modificadas un papel fundamental en el inicio y progresión de la aterosclerosis [49].

Por otra parte, aunque la acetilación de las LDL no ocurre *in vivo*, las LDL acetiladas (LDL-Ac) son un modelo de LDL modificada ampliamente utilizado en estudios acerca del metabolismo y procesamiento del colesterol en el macrófago *in vitro*, dado que aquéllas, y de manera similar a las LDL-Ox, inducen en los macrófagos un fenotipo espumoso que recuerda el que éstos poseen en la lesión aterosclerótica. Su uso fue instituido por Goldstein y Brown cuando descubrieron la existencia de los receptores *scavenger* en los macrófagos. Estos y otros investigadores habían observado la formación de depósitos de colesterol en macrófagos de pacientes con deficiencias en el rLDL, por lo que este receptor no podía ser el responsable de la captación de las LDL, sino que tendría que haber, por tanto, un mecanismo alternativo. Para estudiar el mecanismo de deposición de colesterol Goldstein y Brown decidieron acetilar las LDL, modificación que bloquea el grupo ϵ -amino de las lisinas de la apo B, de tal manera que la partícula no es reconocida por el rLDL [51]. Posteriormente, se descubrió que las LDL-Ox, mediante su incubación en presencia de células endoteliales, musculares lisas o monocitos, también causaban la acumulación de colesterol en los macrófagos [50]. Por lo tanto, estas células son capaces de captar lipoproteínas modificadas mediante un mecanismo no regulado por el contenido celular de colesterol. Así, tras la captación y degradación lisosomal de las LDL modificadas, el colesterol resultante se deposita en el citoplasma en forma de gotas lipídicas de colesterol esterificado, responsables del aspecto espumoso de los macrófagos. Es pertinente indicar que las LDL-Ac son más eficientes que las LDL-Ox induciendo dichos depósitos, dado que las segundas contienen componentes que distorsionan su procesamiento lisosomal [52].

1.5.4. HDL

Las HDL (d=1,063-1,021 kg/l) son una clase de lipoproteínas muy heterogénea, con muchas subfracciones, y con un metabolismo complejo. Su tiempo de residencia en plasma es de 4 a 5 días. La función fundamental de las HDL es el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, en un proceso denominado transporte reverso de colesterol [45, 46], del que hablaremos más adelante (apartado 4). Se considera que, salvo determinados casos con deficiencias genéticas, las concentraciones plasmáticas altas de HDL se correlacionan inversamente con el riesgo de padecer aterosclerosis, concepto derivado de los estudios epidemiológicos [53]. Aunque las HDL tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitrombóticas y vasodilatadoras, gran parte de su actividad antiaterogénica se ha atribuido a su capacidad para extraer colesterol y oxiesteroles de los macrófagos espumosos y células de músculo liso de la pared arterial [54].

El origen metabólico de las HDL es diverso. La apo A-I, su componente fundamental, se sintetiza tanto en hígado (80 %) como en intestino (20 %), mientras que las otras apolipoproteínas, como la apo A-II, se sintetizan fundamentalmente en el hígado [46]. En la biogénesis de las HDL participan los transportadores ABCA1 y ABCG1 en dos etapas sucesivas. En la primera, ABCA1 cede colesterol y fosfolípidos a la apo A-I, o a un complejo a base de apo A-I y una pequeña cantidad de lípidos (pre β_1 -HDL), que se encuentra en el medio extracelular, generándose HDL nacientes, y en la segunda, ABCG1 sigue cediendo colesterol a la partícula [54]. Las HDL nacientes, también llamadas pre β -HDL (pre β hace referencia a su movilidad electroforética), son discoidales, relativamente ricas en proteína (apo A-I) y fosfolípidos y pobres en colesterol [55]. El colesterol libre adquirido por la HDL es esterificado con un ácido graso insaturado proveniente de la fosfatidilcolina, por acción de una enzima de origen hepático, la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), y los ésteres que se forman, apolares, se disponen en el interior de la partícula. Sucesivamente, la partícula va agrandándose y adoptando forma esférica, con lo que se transforma en una HDL₃, con migración electroforética α , típica de la inmensa mayoría de las HDL plasmáticas. Las HDL₃ constituyen una población heterogénea que, en promedio, contienen 3 o 4 moléculas de apo A-I, varias de apo C y ninguna o varias de apo A-II por partícula [46]. Se poseen evidencias de que la acción de la LCAT da origen a la formación de HDL que contienen apo A-I y apo A-II mediante la fusión de partículas que contienen una u otra apolipoproteína [56]. En consonancia con esto, los individuos con deficiencia de LCAT presentan, además de una considerable reducción en la concentración de HDL, una disminución de la fracción que contiene apo A-I y apo A-II conjuntamente [57, 58].

Las HDL₃ pueden seguir recogiendo colesterol y fosfolípidos de las células. Así mismo, pueden incorporar estos lípidos y apolipoproteínas procedentes, como se ha dicho, de las lipoproteínas con apo B, con la participación de la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) en la transferencia de fosfolípidos. Todo ello aumenta el tamaño de la HDL, que se transforma en HDL₂. Sobre ellas actúa la CETP, con lo que ceden ésteres de colesterol a las VLDL y LDL a cambio de triglicéridos [46].

Las HDL pueden interaccionar con el receptor CLA-1/SR-BI y ceder selectivamente colesterol a las células sin ser captadas. Este proceso es particularmente activo en tejidos esteroideogénicos, donde se utiliza el colesterol para la síntesis de hormonas esteroídicas, así como en la cesión del colesterol al hígado en el transporte reverso de colesterol. La HDL resultante es más pequeña y pobre en colesterol, con lo que queda habilitada para captar más colesterol de los tejidos periféricos. La cesión de colesterol al hígado y el reciclaje de la partícula HDL pueden ser promovidas mediante la hidrólisis de sus fosfolípidos a cargo de la HL y la lipasa endotelial [59].

El catabolismo de la apo A-I tiene lugar en el hígado, principalmente, y en el riñón. Un mecanismo implicado en la captación hepática de las HDL puede ser el reconocimiento de la apo E mediante el rLDL, si bien la proporción de HDL con apo E en la circulación humana es muy reducida. Se ha descrito que la cadena β de la ATP sintasa, que se localiza en la MP del hepatocito, puede actuar como receptor para la apo A-I e inducir la endocitosis de HDL (apartado 4.2) [60]. En lo que se refiere a la degradación renal, las HDL suficientemente pequeñas pasan al filtrado glomerular para ser posteriormente captadas en el túbulo proximal

mediante el reconocimiento de su apo A-I por el receptor cubilina, el cual está asociado a la MP mediante el receptor megalina [60].

1.5.5. Dislipemias

Comenzaremos este apartado describiendo las hipercolesterolemias monogénicas. Todos los genes defectuosos en pacientes con hipercolesterolemia monogénica están relacionados con la captación de LDL, a través del rLDL, por el hígado [61]. La más conocida de ellas es la hipercolesterolemia familiar, descrita por Goldstein y Brown, que consiste en mutaciones en el gen del rLDL, y que es una de las enfermedades metabólicas hereditarias más comunes [62]. Aproximadamente la mitad de estos pacientes desarrollan xantomas en los tendones, xantelasmas y arco corneal prematuro y enfermedad coronaria. Los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos tienen elevadas las concentraciones de colesterol-LDL más de 5 veces y desarrollan aterosclerosis severa antes de los 20 años de edad [61]. Otra causa de hipercolesterolemia aunque mucho menos frecuente es la deficiencia de la apolipoproteína B familiar, una enfermedad que consiste en mutaciones en el gen de la APOB que impiden su reconocimiento por el rLDL. Los pacientes con deficiencia de la apolipoproteína B familiar tienen características clínicas semejantes a los de hipercolesterolemia familiar aunque las concentraciones de colesterol-LDL y el riesgo de enfermedad coronaria son menores que en aquellos [61, 63]. El tercer gen cuya mutación puede ser causa de hipercolesterolemia es el de PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin-like kexin type 9*). PCSK9 es una proteasa que interviene en la degradación del rLDL (apartado 2.1) [64]. Las mutaciones que llevan a la ganancia de función de PCSK9 se asocian a hipercolesterolemia [65] mientras que las mutaciones que conducen a la pérdida de función de dicha proteína se han asociado a concentraciones bajas de colesterol-LDL y menor riesgo de enfermedad coronaria [61]. El cuarto gen implicado en este tipo de patología es el de la proteína adaptadora del rLDL (LDLRAP1). Este receptor está implicado en ensamblaje del rLDL en las vesículas recubiertas de clatrina, por lo que es esencial para la endocitosis mediada por el rLDL [61]. Por último, una enfermedad poco frecuente, pero que también es causa de hipercolesterolemia, es la sitosterolemia. Esta enfermedad está provocada por mutaciones en los transportadores ABCG5 y ABCG8. Los pacientes sitosterolémicos tienen altas concentraciones plasmáticas de colesterol así como de esteroides de plantas (sitosterol y campesterol) [61].

Las hipoalfalipoproteinemias constituyen otro tipo de dislipemia que se caracterizan por una baja concentración plasmática de las HDL. Existen tres genes cuyas mutaciones son causa de hipoalfalipoproteinemia. Ellos son el gen de la apo A-I, de ABCA1 y de la LCAT. La apo A-I es la lipoproteína fundamental constitutiva de las HDL, y se han reportado mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas que llevan a una deficiencia total o severa de apo A-I y de HDL (colesterol HDL < 10 mg/dl). Sin embargo, solo aproximadamente la mitad de ellas se asocian a enfermedad coronaria prematura [61]. Es interesante el caso de la mutación conocida como apo A-I Milano, que se presenta en heterocigosis y la cual reduce a la mitad las concentraciones de colesterol-HDL, sin que los portadores presenten aterosclerosis [66]. Otras mutaciones de apo A-I causan reducciones variables de las concentraciones de HDL, sin una asociación consistente con enfermedad coronaria [61]. ABCA1 media la salida del colesterol celular y los fosfolípidos hacia la apo A-I o la partícula HDL naciente pobre en lípidos. Se han identificado más de 50 variantes estructurales y el defecto en homocigosis causa la enfermedad de Tangier, que se caracteriza

por la acumulación de macrófagos cargados de lípidos en los distintos tejidos y una deficiencia prácticamente total de HDL [67-69]. Las características clínicas asociadas pueden incluir amígdalas agrandadas y de color anaranjado, neuropatía periférica y enfermedad coronaria prematura. Sin embargo, algunos pacientes con la enfermedad de Tangier no desarrollan aterosclerosis [54, 70]. Las mutaciones en la LCAT, la cual cataliza la esterificación del colesterol libre en las lipoproteínas, interfieren en la maduración de las partículas de HDL nacientes. Las mutaciones en homocigosis dan lugar a una marcada reducción de las concentraciones de colesterol-HDL (5-10 % del normal) y opacidades corneales, por lo que originalmente se la denominó enfermedad del ojo de pescado. Cuando la deficiencia de la enzima es completa se acompaña de anemia hemolítica y enfermedad renal, mientras que cuando es parcial tan solo existe opacidad corneal. La asociación entre la deficiencia de LCAT y la aterosclerosis no está clara [61].

Por último veremos la hipobetalipoproteinemia y la abetalipoproteinemia. La hipobetalipoproteinemia está causada por mutaciones del gen de la apo B que producen formas truncadas de esta apolipoproteína, que pierde sus funciones de estabilización de la lipoproteína en proporción mayor cuanto menor sea su tamaño. Si la forma truncada dispone de más del 48 % de la secuencia total, los quilomicrones se sintetizarán normalmente, pero las VLDL serán más pequeñas y se sintetizarán en menor cantidad y, además, sufrirán un catabolismo más acelerado de lo habitual, con la consiguiente disminución en la concentración de LDL. Si la forma truncada tiene un tamaño menor del 30 %, todas las lipoproteínas que la contienen son inestables, incluidos los quilomicrones, y no se secretan al plasma o la linfa [71]. Las alteraciones de la MTP conducen a la abetalipoproteinemia, en la que se ve afectada tanto la síntesis de VLDL como de quilomicrones. Los homocigotos presentan una drástica disminución de los lípidos en plasma y una deficiencia de lipoproteínas con apo B, estando presentes solo las HDL [45]. Por último mencionaremos la enfermedad de Anderson, también conocida como enfermedad de la retención de quilomicrones, en la que no se detectan quilomicrones en el plasma. Esta enfermedad es consecuencia de la disfunción de Sar1b, GTPasa pequeña codificada por el gen SARA2 y la cual es esencial para el transporte de los quilomicrones nacientes desde el RE al aparato de Golgi para su maduración y secreción [72]. En estas enfermedades la manifestación clínica más evidente es la malabsorción grasa, con esteatorrea y esteatosis de la mucosa intestinal. Aparte de verse afectada la asimilación de los ácidos grasos y el colesterol de la dieta, disminuye la absorción de las vitaminas lipofílicas, como las vitaminas A y E, con grave repercusión en el desarrollo [45].

2. Captación celular de lipoproteínas

La captación celular de lipoproteínas se lleva a cabo a través de diversos receptores. Éstos, junto con la biosíntesis de colesterol, constituyen el mecanismo mediante el cual la mayoría de las células se abastecen del colesterol que necesitan para sus distintas funciones. En otros casos estos receptores sirven para eliminar el exceso de colesterol lipoproteico que se encuentra en el medio extracelular o se integran en la vía de excreción del excedente de colesterol en los tejidos periféricos.

2.1. *Receptor de LDL*

El rLDL, primer receptor de lipoproteínas identificado, fue descubierto por Goldstein y Brown en 1974 mientras investigaban acerca de la hipercolesterolemia familiar. Es una proteína de membrana de 839 aminoácidos, con cinco dominios, los tres primeros expuestos hacia el medio extracelular, otro que ancla la proteína a la membrana y el último que es citoplasmático. El dominio 1, en la región N-terminal, es el de reconocimiento de la apo B-100 y también de la apo E; presenta siete bucles característicos ricos en restos de cisteína, entre los que se establecen puentes disulfuro, y aminoácidos ácidos, como aspártico y glutámico, que interaccionan con las regiones ricas en aminoácidos básicos, como arginina y lisina, de la apo B-100 y la apo E. El dominio 2 presenta una alta homología con el precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El dominio 3 contiene diversos sitios de glicosilación. El dominio 4 es la región hidrofóbica que atraviesa la membrana. Finalmente, el dominio 5, citoplasmático, contiene la secuencia de internalización (XNPXY), la cual interacciona con la clatrina y permite que el receptor se localice precisamente en las llamadas fosas recubiertas de clatrina. Estas fosas tienen la propiedad de invaginarse formando endosomas, que contienen las lipoproteínas (LDL y partículas remanentes) unidas al receptor. Por un descenso del pH en el endosoma, se disocian los complejos lipoproteína-rLDL, lo que permite que las moléculas de receptor recirculen hacia la MP, donde vuelven a ejercer su función. Para dicha disociación del rLDL es crítico el dominio 2 del receptor, de manera que una región específica (*β -propeller*) de éste interacciona con las repeticiones 4 y 5 de unión al ligando, desplazándose así la partícula lipoprotéica [73]. A continuación, los endosomas se funden con lisosomas y las lipoproteínas son hidrolizadas por acción de las enzimas lisosomales. Los productos finales de esta hidrólisis -colesterol libre, ácidos grasos y aminoácidos- son finalmente transferidos al citoplasma y, subsiguientemente, otras estructuras celulares para su utilización o esterificación. Concretamente, el colesterol es transportado a la MP, principal reservorio de este lípido, o al RE, donde puede ser esterificado por la ACAT, lo que resulta en la formación de gotas lipídicas que se acumulan en el citoplasma [45].

La expresión del rLDL está regulada por el contenido celular de colesterol. Ante un exceso de colesterol disminuye la expresión génica y, por otro lado, se estimula la degradación del rLDL. En el primer proceso juegan un papel fundamental los factores de transcripción SREBP, que detallaremos más adelante (apartado 5.1), ya que controlan la expresión del gen del rLDL. Por otro lado, PCSK9 regula la cantidad de receptor mediante la degradación del mismo. PCSK9 es una proteasa que sufre un procesamiento autocatalítico en la ruta de secreción. La forma madura se excreta al medio extracelular y se une al dominio homólogo del precursor de EGF del receptor, lo que resulta en la posterior degradación lisosomal del mismo. Por tanto, la pérdida de función de esta proteasa incrementa la cantidad de rLDL y disminuye la concentración de colesterol LDL en plasma, y la ganancia de función de la misma produce el efecto contrario, por lo que es causa de una forma de hipercolesterolemia. Al igual que el rLDL, PCSK9 es diana de SREBP [74, 75]. Existe otra proteína, llamada Idol (*inducible degrader of the LDL receptor*), que promueve la degradación del rLDL. Idol es una ubiquitina ligasa E3 que está regulada por el factor de transcripción LXR (*liver X receptor*) y que, en respuesta a un aumento en el colesterol celular, incrementa su expresión y la degradación del rLDL [76]. Sin embargo, la expresión del rLDL, al igual que la de la HMGCoAR, no solo responde a la disponibilidad de colesterol sino

también a otros factores. Entre los inductores de la transcripción de los genes del rLDL (LDLR) y de la HMGCoAR (HMGCR) se incluyen una gran variedad de moléculas como la insulina [77], los estrógenos [78, 79], los ésteres de forbol [80], el factor de necrosis tumoral (TNF- α) [81], el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [82], la interleucina-1 β [82] y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [83].

El rLDL se expresa en prácticamente todas las células del organismo. El órgano que presenta una mayor actividad de dicho receptor es el hígado, por lo que es el principal órgano para la eliminación de las LDL del plasma, pero la mayor actividad específica corresponde a la glándula suprarrenal, donde se sintetizan elevadas cantidades de hormonas esteroídicas a partir del colesterol lipoproteico. La actividad global del rLDL en el organismo determina la tasa catabólica fraccional de las LDL y, consecuentemente, la deficiencia de este receptor es la causa de la hipercolesterolemia familiar, asociada a un elevado riesgo cardiovascular [45].

Aunque el destino de la partícula captada por el receptor suele ser la degradación, en ciertos casos de células con polaridad aquélla es captada en una cara de la célula, transportada a través de ésta y liberada intacta en la cara opuesta en un proceso llamado transcitosis. Se ha propuesto que esto ocurre en células endoteliales, donde la partícula es captada en la cara luminal y liberada en la cara basal, permitiendo así, por ejemplo, el tráfico de LDL a través de la barrera hematoencefálica [84].

2.2. Otros receptores de la familia del receptor de LDL

Se han identificado numerosas proteínas de membrana con analogía con el rLDL que, junto con éste, constituyen la denominada familia del rLDL [85]. Entre ellas están el LRP (*LDL receptor-related protein*), la megalina, el receptor de VLDL (rVLDL), apo ER2 (*apo E receptor 2*) y LR11, también conocido como SorLA. Todas poseen un número variable de regiones con alta homología con el dominio rico en cisteínas del rLDL, por lo que se supone que aquél es el dominio de reconocimiento de las lipoproteínas, así como de los dominios homólogos al precursor de EGF y a la secuencia citoplasmática de captación. Tienen en común, además, la capacidad de unir apo E y RAP (proteína que se aísla asociada a LRP). Se diferencian, sin embargo, en que solo el rLDL es regulado por el contenido intracelular de colesterol mediante la vía de los SREBP (apartado 5.1) [45]. Por otro lado, el rVLDL y apo ER2 son, al igual que el rLDL, dianas de Idol [76].

El rVLDL es abundante en tejido adiposo y en los músculos esquelético y cardíaco, todos los cuales poseen un activo metabolismo de ácidos grasos y donde este receptor puede facilitar la captación de triglicéridos lipoproteicos. También se expresa en macrófagos y cerebro. El rVLDL reconoce las lipoproteínas que contienen apo E. El receptor LRP se expresa fundamentalmente en hígado, donde puede desempeñar un papel importante en la captación de lipoproteínas remanentes mediante su interacción con la apo E. También se expresa en macrófagos y en cerebro, donde puede participar en el activo metabolismo lipídico que se da en ellos. La megalina, también conocida como gp330 o LRP-2, se expresa en células de diversos epitelios absortivos, tales como los de intestino, riñón y saco vitelino. Este receptor reconoce tanto la apo E como la apo B-100, incluyendo formas truncadas de esta proteína. Se ha propuesto, que la megalina desarrolla un papel importante en el activo catabolismo renal de aquellas formas truncadas de la apo B-100 que carecen del dominio de unión al rLDL. Además, la megalina

también puede mediar la endocitosis de las HDL, para lo cual coopera con la cubilina [86]. Apo ER2, también conocido como LR7/8B, se expresa particularmente en cerebro, testículo y placenta. Debido a su interacción con la proteína Reelin es especialmente importante en el cerebro, ya que interviene en la localización neuronal durante el desarrollo de éste, y en su madurez modula la plasticidad sináptica y favorece la memoria y el aprendizaje espacial. Otros receptores de la familia, LRP1 y SorLa, también se expresan en el cerebro donde pueden ejercer funciones no relacionadas con el metabolismo de lípidos [45, 87].

En general, los receptores homólogos al rLDL interactúan con otros tipos de ligandos aparte de las lipoproteínas. De este modo pueden reconocer a la LPL y a la HL y, de hecho, al rVLDL se le atribuye un papel en la transcitosis de la LPL a través de la célula endotelial en la migración desde las células del tejido subyacente que la sintetizan hasta la superficie luminal del endotelio, ubicación en la que ejercen su función [88]. Dichos receptores también reconocen los complejos formados por proteasas y sus inhibidores correspondientes, por lo que su función va más allá de la participación en el metabolismo de las lipoproteínas [45].

2.3. Receptores “scavenger”

La superfamilia de los receptores *scavenger* consiste en glicoproteínas integrales de membrana que intervienen en el reconocimiento de estructuras polianiónicas de origen endógeno como LDL-Ox y de origen exógeno como los lipopolisacáridos bacterianos. Los miembros de esta familia tienen estructuras diversas que pueden ser catalogados en 8 clases (A-H) [89]. El primero en ser clonado fue el receptor de clase A SR-AI y SR-AII, proteínas homotriméricas productos de un mismo gen mediante ajuste alternativo, las cuales se expresan constitutivamente en los macrófagos de los distintos tejidos. Su propiedad originalmente conocida era la de captar LDL-Ac. Sin embargo, dada la inexistencia de LDL-Ac en condiciones fisiológicas, se consideró simplemente como un receptor para moléculas cargadas negativamente, incluyendo también LDL-Ox [90]. Los receptores SR-A pueden unir moléculas polianiónicas como el ácido lipoteicoico de las bacterias Gram-positivas, el lípido IVA, un precursor del lípido A, de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram-negativas, así como mediar la fagocitosis de las bacterias [91, 92]. Es por esto que dichos receptores tienen un papel relevante en la respuesta del hospedador a la infección.

El segundo grupo es el de los receptores *scavenger* de la clase B, que está compuesto por CD36, CLA-1/SR-BI y CLA-2/SR-BII, entre otros. CD36 es una glicoproteína que se expresa en muchos tejidos como el corazón, músculo, tejido adiposo y plaquetas, y también es abundante en los macrófagos espumosos de las placas de ateroma humanas [93, 94]. *In vitro*, las células que expresan CD36 captan LDL-Ox [95], mientras que las deficientes en este receptor son resistentes a la adquisición del fenotipo espumoso [96]. Su expresión aumenta tras la captación celular de su propio ligando, LDL-Ox, proceso que está mediado por la activación de PPAR γ , y disminuye con interferón γ [97, 98]. Este receptor puede unir otros ligandos como ácidos grasos de cadena larga, trombospondina-1, colágeno, eritrocitos infectados con malaria y lipoproteínas nativas [99]. Los individuos con deficiencias en CD36 tienen un mayor riesgo de sufrir enfermedad coronaria y cardiomiopatía [94].

Las proteínas CLA-1 y SR-BI son las formas homólogas humana y de ratón, respectivamente. El gen que las codifica es SCARB1 y puede generar también, por ajuste

alternativo, la variante CLA-2/SR-BII [89]. El receptor CLA-1/SR-BI es una glicoproteína de 85 kDa (forma inmadura desglicosilada, 55 kDa), con dos dominios transmembrana, al igual que CD36, y que se ubica en las caveolas de la MP de algunos tipos celulares. Se expresa fundamentalmente en hígado, tejidos esteroideogénicos y macrófagos, donde facilita el transporte bidireccional de colesterol a favor del gradiente de concentración [100-103].

In vitro CLA-1/SR-BI reconoce las diversas lipoproteínas nativas, VLDL, LDL y HDL, así como las LDL modificadas por oxidación o acetilación [100]. *In vivo* este receptor parece ser especialmente importante en la captación hepática del colesterol de las HDL, interviniendo así en el transporte reverso de colesterol, aspecto que se tratará en detalle más adelante (apartado 4.2). Estudios *in vitro* realizados con hepatocitos aislados de ratón han revelado que la captación de ésteres de colesterol y también de colesterol libre a través de CLA-1/SR-BI se lleva a cabo de manera selectiva, sin la captación y posterior degradación de la partícula [104], proceso que se pierde completamente en los hepatocitos de ratones *knockout* para dicha proteína [105]. Algunas vías de señalización regulan esta captación selectiva de colesterol, como lo demuestra la estimulación de ésta mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la inhibición de la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) [106]. Por otro lado, estudios en ratones manipulados genéticamente sugieren que CLA-1/SR-BI también tiene la capacidad de reconocer lipoproteínas con apo B *in vivo*. Así, ratones *knockout* para CLA-1/SR-BI presentaron un aumento significativo de la concentración plasmática de colesterol-LDL y VLDL, y, por el contrario, la sobreexpresión de dicho gen resultaba en la práctica desaparición del colesterol de estas lipoproteínas [107, 108]. Ello está de acuerdo con la inespecificidad que muestra este receptor *in vitro* [100].

CLA-1/SR-BI también parece ser fundamental en la provisión de colesterol a los tejidos esteroideogénicos. A este respecto, es interesante resaltar que la expresión de dicho receptor y la captación de colesterol de HDL se regulan de manera coordinada con la síntesis de hormonas esteroídicas [89].

3. Tráfico Intracelular de colesterol

La correcta distribución de colesterol entre los diferentes compartimentos de las células es crítica para muchas de las funciones celulares. Además, pasos claves del procesamiento del colesterol tienen lugar en localizaciones subcelulares diferentes, por lo que el transporte de colesterol entre los diferentes organelos contribuye no solo al mantenimiento de la homeostasis celular sino a controlar el procesamiento de aquel lípido [109].

3.1. Distribución intracelular de colesterol

El colesterol está distribuido heterogéneamente entre las membranas de los distintos compartimentos celulares [110]. En la MP se encuentra la mayor parte del colesterol libre celular, con aproximadamente el 60-80 % del total, representando el 30 % o más de las moléculas lipídicas de esta estructura [111]. En el extremo opuesto, el RE contiene aproximadamente el 5 % del colesterol celular, lo que equivale al 5 % de los moles de los lípidos del RE [112]. El contenido de colesterol del complejo de Golgi está entre el de la MP y el del RE [113], y se ha sugerido que existe un gradiente de concentración que aumenta del cis-Golgi al

trans-Golgi [114]. Por otro lado, el compartimento de los endosomas de reciclaje y los cuerpos multivesiculares contienen la mayor parte del colesterol de la vía endocítica [115-117]. Estas variaciones de concentración de colesterol entre los diferentes orgánulos se mantienen gracias al transporte vesicular y no vesicular de dicho lípido entre los distintos compartimentos celulares [110].

El tráfico vesicular está mediado por vesículas e intermediarios tubulares que mueven membranas, junto con su contenido luminal, entre orgánulos a lo largo de rutas trazadas por el citoesqueleto [109]. Recientemente se ha reportado que ABCG1 (apartado 4.1.2) se localiza en el compartimento endosomal, desde donde facilita la exportación celular de colesterol e impide que éste inhiba la vía de SREBP en el RE (apartado 5.1) [118]. Por otra parte, el tráfico no vesicular utiliza, presumiblemente, proteínas citosólicas transferidoras de lípidos, el contacto directo entre membranas o una combinación de ambos [109]. Existen varias proteínas transferidoras de lípidos que se unen a colesterol, entre las que se encuentran StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), los miembros de la familia START (*StAR-related*) y las OSBP (*oxysterol binding protein*). Además, se ha propuesto que la familia de las ORP (*OSBP-related proteins*) también puede participar en el tráfico no vesicular [109].

3.2. Tráfico entre el retículo endoplásmico y la membrana plasmática

Los esteroides de biosíntesis, incluyendo el colesterol y una fracción considerable de sus precursores, tales como zimosterol, latosterol y desmosterol, son rápidamente dirigidos desde el RE a la MP, donde están disponibles para aceptores extracelulares. En las células de mamíferos, el colesterol es transportado desde el RE a la MP por un mecanismo dependiente de ATP, que no se ve afectado cuando se alteran los microtúbulos o se distorsiona el aparato de Golgi con brefeldina A, lo que apunta a un mecanismo no vesicular [119]. Se han propuesto varios candidatos para mediar el transporte del colesterol de nueva síntesis hasta la MP, entre los que se encuentran la proteína SCP-2 (*sterol carrier protein*) y ORP2. El aumento de expresión de estas proteínas incrementa el transporte entre el RE y la MP [110]. En levaduras las proteínas Osh, homólogas de las ORP, están implicadas en el transporte desde el RE a la MP, pero se ha propuesto que, más que transportando esteroides, estas proteínas influyen en el tráfico modificando la capacidad de la MP para secuestrar esteroides [120]. El colesterol de la MP llega al RE también por transporte no vesicular, ya que este tiene lugar en presencia de inhibidores del tráfico vesicular como la N-etilmaleimida o los inhibidores de la PI3K como la wortmannina y el LY294002 [110, 121, 122].

3.3. Transporte mitocondrial de colesterol

La mitocondria es pobre en colesterol [110], sin embargo el tráfico hacia este orgánulo es particularmente importante debido a que en ella se realizan funciones tan importantes como la conversión del colesterol en 27-hidroxicolesterol [123] o la síntesis de hormonas esteroideas en los tejidos esteroideogénicos [109]. La proteína StAR, que se sintetiza en respuesta a un estímulo hormonal, se requiere para la transferencia de colesterol desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria, donde la acción de la enzima P450SCC, escindiendo la cadena lateral y sintetizando pregnenolona, tiene lugar [124]. StAR contiene un bolsillo que une

una molécula de colesterol e *in vitro* se comporta como una proteína transferidora de lípidos [125]. Sin embargo, su papel *in vivo* parece estar confinado a la cara citosólica de la membrana externa de la mitocondria [126, 127]. Estudios recientes sugieren que StAR pudiera cooperar con otras proteínas de la membrana externa de la mitocondria, como PBR (*peripheral benzodiazepine receptor*), para facilitar el transporte de colesterol de la membrana externa a la membrana interna de dicho orgánulo [110].

Por otra parte, se ha demostrado que la proteína de endosoma tardío MLN64, también conocida como STARD3, se localiza en la membrana del endosoma tardío/lisosoma (ET/L), desde donde promueve la movilización del colesterol hacia la mitocondria [128, 129]. Se ha propuesto, a este respecto, que MLN64 podría facilitar la transferencia de colesterol entre distintos orgánulos, lo que, en el caso que nos ocupa, implicaría un estrecho contacto entre las membranas del ET/L y de la mitocondria [130].

3.4. Salida del colesterol del endosoma tardío y lisosomas

Como ya se ha comentado, parte del colesterol celular puede proceder de fuentes exógenas, particularmente de las LDL y también de los remanentes de quilomicrones y VLDL, partículas que son captadas por endocitosis a través del rLDL. Así, las mismas entran en la vía endosomal, donde su colesterol es entregado al ET/L y los ésteres de colesterol son hidrolizados por la lipasa ácida para dar colesterol no esterificado. Éste sale del ET/L mediante un mecanismo dependiente de NPC1 y NPC2 y es distribuido a distintos compartimentos, como la MP, la mayor parte, y al RE, donde regula su homeostasis y puede ser esterificado por la ACAT [131]. La disfunción de NPC1 o NPC2 causa la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, caracterizada por la acumulación de colesterol no esterificado derivado de LDL en los ET/L [131].

NPC1 es una proteína integral de membrana que se localiza en los ET/L, aunque también se asocia transitoriamente al trans-Golgi [132, 133]. La proteína NPC1 humana consiste en 1278 aminoácidos y contiene trece dominios transmembrana separados por tres lazos luminales glicosilados [134]. También contiene un lazo rico en cisteína, un motivo di-leucina que lo marca para su localización en lisosomas y un motivo de cremallera de leucina que sugiere que NPC1 interactúa con otras proteínas [135]. Una característica importante de NPC1 es que cinco de sus trece dominios transmembrana constituyen un dominio sensor de esteroides [134]. Esta proteína se une tanto a colesterol como a oxiesteroides [136]. NPC1 se expresa en todos los tejidos de ratón y humano analizados, aunque el tejido que más la expresa es el hígado. Su expresión parece estar modulada por esteroides, ya que la cantidad del mRNA de NPC1 disminuye en fibroblastos por acción del 22- o 25-hidroxicolesterol; por el contrario, cuando los fibroblastos son cultivados en un medio deficiente en colesterol o se inhibe la síntesis del mismo, la actividad del promotor y la cantidad del mRNA de NPC1 aumentan [137, 138]. En esta regulación por esteroides se ha implicado a los SREBP ([137]; apartado 5.1).

Por su parte, NPC2 es una proteína soluble expresada ubicuamente que se encuentra en el lumen de los lisosomas, a donde es dirigida por unión al receptor de manosa-6-fosfato [139]. Está compuesta por 151 aminoácidos (131 después de cortarse el péptido señal) y está altamente glicosilada [135]. NPC2 se une a colesterol, pero no a oxiesteroides, con afinidad micromolar. También une ácidos grasos, pero con menor afinidad. Estudios *in vitro* han demostrado que NPC2 es capaz de transferir colesterol entre vesículas de fosfolípidos y que esta

transferencia se ve muy favorecida por la presencia de lípidos como el bis (monoacilglicerol) fosfato y el fosfatidil inositol [140].

Las mutaciones en homocigosis tanto en NPC1 como en NPC2 resultan en fenotipos celulares y clínicos virtualmente idénticos. Los estudios realizados hasta ahora sugieren que estas proteínas actúan en tándem o secuencialmente en la misma vía [135]. Estudios de unión y cristalografía de NPC1 y NPC2 han aportado información muy valiosa sobre la función de estas proteínas. NPC2 enlaza colesterol con alta afinidad en un proceso que es sensible a las modificaciones de la cadena lateral del mismo [141, 142]. El estudio cristalográfico de NPC2 bovino unido a sulfato de colesterol reveló que el colesterol se acomoda en un bolsillo hidrofóbico profundo, con solo el grupo sulfato (que sustituye al -OH en 3β) expuesto al medio [143]. NPC1 también enlaza colesterol y otros esteroides fluorescentes análogos, así como oxisteroides [136, 142, 144]. Recientemente, Kwon et ál. han reportado la estructura cristalina del extremo NH_2 -terminal de NPC1. Así, han revelado que el lazo que éste forma se une a colesterol de manera que el grupo 3β -OH queda sumergido dentro de un bolsillo de unión, mientras que la cadena lateral queda expuesta en la superficie [145]. Como NPC1 y NPC2 parecen enlazar colesterol en orientaciones opuestas, se ha propuesto un modelo para el funcionamiento de las dos NPC. Según este modelo, en el interior del ET/L el colesterol, una vez desesterificado, se une a NPC2, que subsecuentemente lo transfiere al dominio de unión de esteroides del extremo NH_2 -terminal de NPC1 en la membrana que limita el ET/L, desde donde se transfiere a otro orgánulo o a un aceptor citoplasmático [145]. Este modelo predice que NPC1 inserta la cadena lateral del colesterol en la membrana del lisosoma [146]. El papel que juega el dominio sensor de esteroides de NPC1 en este proceso está por definir, ya que mutaciones en este dominio impiden la unión de análogos fotoactivables del colesterol a NPC1 en células intactas [147], pero no se ha demostrado la unión de estos análogos del colesterol al dominio sensor de esteroides [147], dejando así abierta la posibilidad de que la función de este dominio sea la de modular la unión de colesterol al extremo N-terminal de NPC1. Se ha propuesto también un modelo alternativo hipotético en el que NPC1 le transfiere el colesterol a NPC2 [131].

En células deficientes en NPC1 se produce *in vitro* una acumulación considerable de lípidos en el compartimento endosomal/lisosomal, pero solo cuando las células han sido expuestas a LDL. Aunque la captación endocítica de LDL y la hidrólisis de sus ésteres de colesterol son normales en las células deficientes en NPC1, la salida del colesterol de los ET/L está alterada. En consecuencia, en estos orgánulos se acumulan colesterol y esfingolípidos. La inhibición del movimiento del colesterol derivado de las LDL hacia el RE resulta en una alteración de la respuesta homeostática al colesterol. Así, la velocidad de síntesis de colesterol y la de captación de LDL por el rLDL, reguladas por la vía de SREBP (apartado 5.1), están aumentadas, y la velocidad de esterificación de colesterol está disminuida respecto a las células normales. Pero, además, en esta situación el colesterol captado no puede activar la vía de LXR, debido a una deficiencia en la generación de 25- y 27-hidroxicolesterol [148], que se sintetizan en otros orgánulos celulares. Por otro lado, la cantidad de colesterol derivado de LDL que alcanza la MP desde los ET/L disminuye [135]. Por el contrario, el transporte intracelular del colesterol suministrado exógenamente con HDL no está afectado en la deficiencia de NPC1, presumiblemente porque dicho colesterol no accede a los ET/L [149]. Por otra parte, el

transporte del colesterol sintetizado endógenamente hacia la MP no está reducido significativamente en las células con deficiencia de NPC1. Después de incorporarse a la MP, este colesterol puede acumularse en los ET/L, aunque a una velocidad mucho menor que el colesterol derivado de LDL [135].

El mecanismo por el cual el colesterol es transportado desde el sistema de endosomas al RE, la MP y los endosomas de reciclaje no se ha definido a nivel molecular. Recientemente, se ha descrito un mecanismo de transporte vesicular de colesterol desde los ET hacia el trans-Golgi y el RE que involucra al complejo SNARE [150]. Parece ser que el transporte mediante yuxtaposición de la membrana donante y la membrana aceptora o el transporte mediante las OSBP participan en el transporte del colesterol fuera de los ET/L [135].

Mención aparte merecen las proteínas Rab, que constituyen la rama más numerosa de la superfamilia de las GTPasas. Las Rab regulan pasos fundamentales en el tráfico vesicular como la formación y anclamiento de vesículas y la fusión de las membranas de las vesículas con las del compartimento diana. Estas tareas son llevadas a cabo por una serie de moléculas efectoras que se unen a las Rab cuando estas están unidas a GTP. Por otro lado, las cascadas de las Rab parecen conferir direccionalidad al tráfico de membranas y conectan cada paso con el siguiente a lo largo de la ruta del tráfico endosomal [151]. Así, los eventos tempranos de la vía endocítica están regulados por Rab5 y Rab15. Rab5 facilita la segregación de la carga en vesículas recubiertas de clatrina y promueve la movilidad del citoesqueleto y la fusión de los endosomas tempranos monotípicos. Por el contrario Rab15 inhibe el transporte de los endosomas tempranos oponiéndose a la actividad de Rab5 [152]. Las moléculas que alcanzan los endosomas tempranos son subsecuentemente clasificadas para reciclarse a la MP o para transportarlas a los lisosomas para su degradación. Para su reciclaje, las moléculas pueden ser dirigidas a microdominios que contienen Rab4 dentro del endosoma temprano o se pueden dirigir a los endosomas de reciclaje donde Rab11 regula el transporte de vuelta a la membrana. Las moléculas destinadas a la degradación son transportadas del endosoma temprano al endosoma tardío y de allí al lisosoma con la participación de Rab7. Por su parte, Rab9 participa en el transporte entre el endosoma tardío y el trans-Golgi [152]. El aumento de expresión tanto de Rab7 como de Rab9 logra superar el atasco de colesterol presente en el fenotipo NPC [153, 154]. Por otro lado, Rab8 regula la expresión de ABCA1 en la superficie de la MP y facilita la exportación de colesterol en macrófagos primarios humanos [155].

4. Transporte reverso de colesterol

Las células de los tejidos periféricos, a excepción de los esteroideogénicos, son incapaces de metabolizar el colesterol, siendo la exportación al medio extracelular la principal vía para eliminar el exceso de este lípido. La mayoría de las células tan solo tiene una limitada capacidad para oxidarlo, añadiéndole un grupo hidroxilo para incrementar su solubilidad y secretar los oxisteroles derivados (27- y 24(S)-hidroxicolesterol principalmente) al medio, aunque éste es un mecanismo de transporte comparativamente minoritario [59]. El hígado, sin embargo, es capaz de degradar el colesterol parcialmente, convirtiéndolo en ácidos biliares, o bien de excretarlo como tal junto con estos últimos en la bilis. Todo ello determina que el colesterol excedente en los tejidos periféricos deba transportarse hasta el hígado para su excreción

El mantenimiento de concentraciones óptimas de colesterol celular es esencial para el

intracelular hasta dicha membrana mediante la activación de PKC [157]. La relevancia fisiopatológica que puede tener la eficiencia de la exportación del colesterol celular la ilustra el reciente hallazgo de que la capacidad del suero de individuos humanos para tomar colesterol de los macrófagos *in vitro* se correlaciona inversamente con el desarrollo de aterosclerosis de manera independiente de las concentraciones plasmáticas de colesterol-HDL y apo A-I [158]. Esto, además, indica que en la acción ateroprotectora de las HDL la funcionalidad de éstas es más relevante que su concentración.

Existen tres mecanismos fundamentales de salida del colesterol celular u oxisteroles derivados. La primera es la difusión pasiva, también llamada acuosa. La segunda es el transporte facilitado, que utiliza al receptor *scavenger* CLA-1/SR-BI. La tercera es el transporte activo a través de los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Además, en el caso de macrófagos y adipocitos, el colesterol puede exportarse asociado a la apo E que estas células sintetizan. Por otro lado, las células pueden deshacerse de colesterol mediante la secreción de exosomas [159]. Se ha estimado que la exportación activa de colesterol a través de ABCA1 y ABCG1, regulada por el contenido celular de colesterol, representa hasta el 70 % de la salida de colesterol desde los macrófagos cuando éstos han sido cargados con dicho lípido [70]. Sin embargo, es preciso mencionar que, *in vitro*, en macrófagos no cargados con colesterol la difusión acuosa tiene una importante contribución relativa a la exportación de dicho lípido. Este mecanismo es poco específico en cuanto al aceptor extracelular del colesterol, el cual puede ser no solo distintas lipoproteínas sino también la albúmina, y opera en ambos sentidos en función del gradiente de concentración [59]. En este apartado describiremos el papel de cada uno de los transportadores implicados en la exportación celular de colesterol.

Los transportadores ABC constituyen una gran familia de proteínas que están presentes en todos los seres vivos. El motivo ABC consta de aproximadamente 120 aminoácidos y contiene tres dominios pequeños conservados en posiciones no continuas llamadas secuencias distintivas. Los miembros de esta familia se catalogan en siete grupos (ABCA a ABCG), aunque tradicionalmente se han dividido en “medio transportadores” y “transportadores completos”. Los primeros contienen seis dominios transmembrana y un motivo ABC, que une ATP, y necesitan formar homodímeros o heterodímeros para ser transportadores funcionales. Los segundos contienen dos repeticiones en tándem de seis dominios transmembrana y dos motivos ABC. Estas proteínas median el transporte, casi siempre unidireccional e irreversible, de una gran variedad de moléculas, incluidos fosfolípidos, esteroides, ácidos biliares, péptidos y variedad de fármacos, a través de bicapas lipídicas mediante la translocación de dichas moléculas desde una capa a la otra (*flippases*) en un proceso que requiere la unión e hidrólisis de ATP [160, 161]. En el caso concreto de ABCA1 y ABCG1, se ha propuesto que translocan colesterol y fosfolípidos desde la capa interna a la externa de la MP, de donde los toma un aceptor [70].

4.1.1. ABCA1

El transportador ABCA1 consta de 2261 aminoácidos y un peso molecular de 220 kDa [162]. Es uno de los llamados “transportadores completos” y se localiza tanto en la superficie como en determinados orgánulos del interior de las células de muchos tejidos [160]. La función de ABCA1 es propiciar la salida unidireccional de colesterol y fosfolípidos hacia la apo A-I o hacia pre β ₁-HDL, partícula que consta de una molécula de apo A-I y unas pocas moléculas de

fosfolípidos y colesterol libre, y constituye el precursor más temprano de las HDL maduras (apartado 1.5.4). En consonancia con esto, la deficiencia de ABCA1 causa la enfermedad de Tangier, caracterizada por la práctica ausencia de HDL en el plasma. Aunque el aceptor canónico del colesterol y los fosfolípidos transportados por ABCA1 es la apo A-I, este transportador también puede ceder aquellos lípidos a otras apolipoproteínas, como apo E, apo A-II, apo C-II, etc., en mucha menor medida a las partículas HDL pequeñas, como las HDL₃, y nada a la fracción de HDL₂ [54]. Se ha comprobado *in vitro* que este transportador también es capaz de ceder los anteriores lípidos a péptidos sintéticos con hélices anfipáticas [163].

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales ABCA1 cede colesterol a la apo A-I. Algunos tienen lugar en la superficie externa de la MP, membrana que suele contener la gran mayoría del colesterol celular, y otros en el interior celular. En la MP apo A-I puede unirse directamente a ABCA1 para promover un transporte de alta afinidad y baja capacidad [164]. También en la MP apo A-I puede unirse a regiones o protuberancias lipídicas ricas en colesterol creadas por la actividad de ABCA1, induciendo así un transporte de alta afinidad y alta capacidad [165, 166].

En otro de los mecanismos propuestos, la apo A-I se une a ABCA1 en la superficie celular y el complejo resultante es transportado hacia los ET/L, donde la apo A-I se asocia a lípidos para ser secretada posteriormente, acompañada con los mismos, por exocitosis, proceso conocido en su conjunto como retroendocitosis. Sobre este mecanismo, muy debatido en los últimos años, se han aportado evidencias desde el año 1999, cuando se mostró que la apo A-I podía ser captada por los macrófagos y secretada luego, mediando la salida de colesterol al medio por un mecanismo dependiente de calcio [167]. Estudios posteriores demostraron que fibroblastos de sujetos con mutaciones que causaban la pérdida de función de ABCA1 presentaban defectos en el tráfico intracelular de colesterol y fosfolípidos y su acumulación en ET [168]. También se aportaron evidencias de la localización de ABCA1 y apo A-I en ET/L [169]. Por otra parte, mutaciones en el gen de NPC1, que inhibe la translocación del colesterol desde el lisosoma al citoplasma resultan en una disminución de la salida de colesterol desde la célula hacia apo A-I [170]. Además, cuando células expuestas a LDL-Ac se tratan con ciclosporina para retener a ABCA1 en la MP, se produce una menor captación de apo A-I y una disminución de la cesión de colesterol a dicho aceptor [171].

Se ha identificado en ABCA1 un dominio citoplasmático que contiene una secuencia rica en Pro, Glu, Ser y Thr (PEST), típica de proteínas de recambio rápido y la cual determina la susceptibilidad de ABCA1 a la degradación por la calpaína. Dicha secuencia, además, está implicada en la internalización de ABCA1 [172]. Así, la eliminación de PEST resulta en una acumulación de ABCA1 en la MP y una disminución de la concentración de la misma en ET/L. Esto tiene como consecuencia una mayor salida de colesterol de células previamente cargadas con colesterol acompañado con ciclodextrina, que lo cede preferentemente a la MP, y una disminución de la salida de colesterol de células tratadas con LDL-Ac, las cuales se procesan mediante la vía endosomal [172]. Por otro lado, la unión de apo A-I estabiliza a ABCA1 y facilita su reciclaje y acumulación en la superficie celular, lo cual se debe a una reducción de la proteólisis dependiente de PEST y tiene como consecuencia un incremento en la generación de HDL [173-175].

Otros estudios, a la vez que han confirmado la internalización y acumulación de ABCA1/apo A-I en ET/L, señalan que la mayor parte de la apo A-I resecretada está degradada, si bien en estos casos el sistema endosomal celular no había sido cargado con colesterol [176, 177]. Todo lo anterior indica que los mecanismos de retroendocitosis y cesión de colesterol de la membrana en la superficie celular mediados por ABCA1 pueden coexistir, aunque su contribución relativa depende del contenido de colesterol en el compartimento endosomal/lisosomal y la MP respectivamente.

La expresión de ABCA1, cuya vida media es de 1 a 2 h, está muy regulada a nivel transcripcional y postranscripcional. El gen de ABCA1 es una diana de los factores de transcripción LXR y, como tal, su expresión aumenta en respuesta a la carga con colesterol u oxisteroles (apartado 5.2) [178]. También a nivel transcripcional, la expresión de ABCA1 aumenta en respuesta a la activación de PPAR α y PPAR γ , efecto mediado por la inducción de LXR α [179, 180] (apartado 5.3). El AMP cíclico (cAMP) estimula la transcripción de ABCA1 mediante un elemento CRE localizado en el primer intrón del gen de ratón, sitio no conservado en el gen humano [181]. A nivel postranscripcional, ABCA1 está regulado por miR-33, miR-758 y por miR-144, tres microRNA (miRNA) que tienen a ABCA1 como una de sus dianas, por lo que reducen la cantidad del mRNA del transportador [182-185]. En cuanto a su regulación postraduccional, varias proteínas como la α 1-sintrofina, la β 1-sintrofina, la calmodulina y la apo A-I interaccionan con ABCA1 y disminuyen su velocidad de degradación. Por otro lado, los ácidos grasos insaturados desestabilizan a ABCA1, efecto debido a su fosforilación mediante la vía de PKC δ [178].

Varias quinasas están implicadas en la regulación de la actividad y estabilidad de ABCA1 por la apo A-I, entre las que se encuentran la proteína quinasa A (PKA), la PKC, la quinasa Janus 2 (JAK2) y la caseína quinasa (CK2). La interacción de apo A-I con ABCA1 aumenta el contenido celular de cAMP y la fosforilación de ABCA1. Esta fosforilación es importante para la actividad de ABCA1, como lo demuestra el hecho de que mutaciones en el sitio de fosforilación por la PKA disminuyen significativamente la cesión de fosfolípidos a la apo A-I. Ésta también activa la fosforilación de ABCA1 por PKC α , la cual protege a ABCA1 frente a la degradación por calpaína. Por el contrario, la fosforilación de Thr-1286 y Thr-1305 en la secuencia PEST promueve la degradación por calpaína, efecto que es revertido por la apo A-I. La fosforilación de Thr-1242, Thr-1243 y Ser-1255 de ABCA1 por CK2 disminuye su actividad flipasa, la unión de apo A-I y la salida de lípidos. La calmodulina interacciona con ABCA1 en una región próxima a la de CK2 y esta interacción regula la degradación de ABCA1 mediada por calpaína. Por otro lado, la interacción de apo A-I con ABCA1 estimula la autofosforilación de JAK2, que a su vez activa la exportación de lípidos a través de ABCA1. Además, se ha reportado que la ciclosporina A y el FK506 interfieren en la salida de colesterol dependiente de ABCA1 mediante la inhibición de la vía de calcineurina/JAK2 [178]. Por último, se ha descrito que el complejo LXR β /RXR interacciona con ABCA1 en la membrana de macrófagos cuando no se acumula colesterol celular; cuando éste se acumula LXR β /RXR se disocia de ABCA1, permitiéndole exportar colesterol [178].

4.1.2. ABCG1 y ABCG4

Los miembros de la subfamilia ABCG son “medio transportadores” que tienen un conocido papel en el transporte de lípidos a través de membranas [186]. De ellos, ABCG1 y ABCG4, de 74 y

72 kDa respectivamente, forman homodímeros que median la salida de colesterol, fundamentalmente, hacia las HDL. La expresión de ABCG4 se restringe a astrocitos y neuronas del sistema nervioso central, siendo abundante en cerebro y ojo y nula en macrófagos, y aquella no está regulada por LXR [160, 187-189]. Por el contrario, ABCG1 está presente en multitud de tejidos, incluyendo neuronas y astrocitos, aunque es especialmente importante en macrófagos, y su expresión aumenta en respuesta a la activación de LXR [160]. Hasta el momento no se han identificado mutaciones funcionales de estos genes que den lugar a enfermedades monogénicas en humanos, aunque recientemente se han identificado varios polimorfismos en el gen de ABCG1 asociados a enfermedad cardiovascular [190].

ABCG1 media la transferencia unidireccional de colesterol, cuya eficiencia depende de las características del aceptor, siendo más eficiente para HDL pequeñas [191]. *In vitro*, el aumento de expresión de ABCG1 incrementa la salida de colesterol hacia HDL₂, HDL₃, LDL, vesículas con fosfolípidos, complejos de apo A-I con fosfolípidos, o ciclodextrina, pero en ningún caso hacia la apo A-I o pre β ₁-HDL. Por su parte, en macrófagos *knockdown* para ABCG1 y cargados de colesterol, disminuye la salida de éste hacia aquellos aceptores [54]. Por tanto, ABCA1 y ABCG1 pueden actuar secuencialmente, de manera que ABCA1, al ceder colesterol y fosfolípidos a la apo A-I, genera las HDL nacientes que luego reciben colesterol mediante ABCG1 para formar HDL más grandes y ricas en lípidos [192]. Esto es compatible no solo con la ausencia de HDL en la enfermedad de Tangier, causada por la deficiencia de ABCA1, sino también con la acumulación de macrófagos ricos en lípidos en diversos tejidos de los individuos que la padecen, a pesar de poseer ABCG1 y otros mecanismos de exportación del colesterol celular.

En macrófagos peritoneales no cargados con colesterol, ABCG1 se localiza fundamentalmente en el interior celular, y no contribuye significativamente al flujo de colesterol hacia HDL. Sin embargo, ante una sobrecarga de colesterol y consecuente activación de LXR, aumenta la expresión de ABCG1 y este se localiza rápidamente en la MP [193]. Como sucede con ABCA1, PPAR α y PPAR γ incrementan la expresión de ABCG1 (apartado 5.3) [194].

Los macrófagos deficientes en ABCG1 presentan un aumento de la esterificación de colesterol, inducción de la actividad de LXR y de la expresión de sus genes diana y una disminución de la expresión de genes diana de SREBP-2, respuestas todas ellas compatibles con el aumento del contenido celular de colesterol [160, 193, 195] e indicativas de la importancia de dicho transportador en la homeostasis de este lípido. Sin embargo, recientemente se ha cuestionado la relevancia de ABCG1 en la exportación de colesterol en macrófagos humanos tratados con LDL-Ac y agonistas de LXR [196].

Poco se conoce acerca del mecanismo que gobierna la salida de colesterol a través de ABCG1. Por analogía con el modelo propuesto para ABCG5 y ABCG8 en el hepatocito [197], ABCG1 pudiera utilizar ATP para promover la protrusión del colesterol desde la MP hacia la fase acuosa. A continuación, una colisión transitoria con la partícula aceptora puede resultar en la cesión de colesterol y ciertos oxisteroles de la membrana [54]. Es posible que la primera acción de ABCG1 sea el reordenamiento de los fosfolípidos de la membrana para reducir la retención de los esteroides en la misma. Lo que sí se conoce es que el aumento de expresión de ABCG1 aumenta la cantidad de colesterol en la MP así como la velocidad de exportación del mismo, pero sin aumentar la asociación del aceptor a la célula [191]. En respuesta al aumento de expresión de ABCG1 se estimula la salida de colesterol [195, 198, 199] y la de una gran variedad

de esteroides incluyendo oxisteroides como el 7-cetocolesterol, el oxisterol más abundante en las LDL-Ox y las placas de aterosclerosis [200]. Existe controversia respecto a la exportación de fosfolípidos por ABCG1 [59, 195, 198, 199].

En el cerebro ABCG1 y ABCG4 se colocan en vesículas intracelulares de astrocitos y neuronas, donde parecen cooperar para sacar intermediarios de la síntesis del colesterol, como el desmosterol, del RE [187, 188]. Por último, debemos mencionar que se cree que, adicionalmente a su función en la MP, ABCG1 puede ser activo en el aparato de Golgi y en los endosomas de reciclaje, donde también se ha localizado [193]. De hecho, algunos autores defienden que la localización de ABCG1 es exclusivamente endosomal [118].

4.1.3. ABCG5 y ABCG8

Los genes de ABCG5 y ABCG8 se encuentran adyacentes en una disposición “mano a mano” y se expresan coordinadamente inducidos por la activación de LXR [201]. Estas moléculas pertenecen al grupo de los medio transportadores, que necesitan ser glicosiladas y formar heterodímeros entre sí para viajar a la superficie celular y formar un transportador funcional [202]. Se localizan en la membrana canalicular de los hepatocitos, donde median la excreción a la bilis de los esteroides [203, 204], último paso del transporte reverso de colesterol. También se encuentran en la membrana apical de los enterocitos, donde limitan la absorción de fitosteroides y otros esteroides, incluido el colesterol, secretándolos de vuelta al lumen intestinal, desde donde habían sido captados mediante NPC1L1. Como se comentó en el apartado anterior, ABCG5 y ABCG8 podrían utilizar ATP para promover la protrusión y disociación del colesterol desde la membrana a la fase acuosa [197].

Las mutaciones que llevan a una pérdida de función de ABCG5 o ABCG8 causan la sitosterolemia, una patología caracterizada por la acumulación de esteroides vegetales (fitosteroides) fundamentalmente, así como de otros esteroides abundantes en mariscos y de colesterol [201]. Las características clínicas de la sitosterolemia son la xantomatosis y la aterosclerosis, resultando en enfermedad cardiovascular. Dichas mutaciones causan un incremento de la absorción intestinal y un descenso en la eliminación biliar de fitosteroides y colesterol, lo que eleva la concentración de los primeros en el plasma entre 50 y 200 veces [160, 186].

4.1.4. CLA-1/SR-BI

Como se ha mencionado anteriormente (apartado 2.3), además de expresarse en hígado y en tejidos esteroideogénicos, CLA-1/SR-BI se expresa en macrófagos, donde puede mediar el flujo bidireccional de colesterol a favor de gradiente, que en el caso de macrófagos cargados en este lípido será desde las células, y, más concretamente, las caveolas, donde se localiza la forma madura de este receptor, hacia las HDL [101-103]. Este gradiente se ve favorecido por la esterificación del colesterol a cargo de la LCAT [59]. La especificidad de CLA-1/SR-BI en cuanto a partículas aceptoras es similar a la de ABCG1, aunque se ha descrito que las HDL grandes se unen mejor que las pequeñas a aquel receptor [205]. También se ha documentado que SR-BI puede promover la salida de colesterol celular mediante la retroendocitosis de HDL [206].

Los macrófagos *knockdown* para CLA-1/SR-BI no muestran cambios en la salida neta de colesterol hacia HDL, sugiriendo que este transportador no juega un papel importante en el

proceso de exportación de colesterol en aquella célula [54]. Sin embargo, no puede descartarse una significativa contribución *in vivo*, al menos en determinadas situaciones, dado que el trasplante de médula ósea, como fuente de precursores macrofágicos, de ratón deficiente en CLA-1/SR-BI a ratones deficientes en rLDL o apo E incrementa la aterosclerosis [54]. En los macrófagos de lesiones ateroscleróticas humanas se ha localizado la expresión de CLA-1/SR-BI [207]. Este receptor se induce con la diferenciación de monocitos a macrófagos [207].

4.1.5. Apo E

La apo E se sintetiza fundamentalmente en el hígado, cerebro, tejido adiposo y los macrófagos. Aunque suele ser minoritaria, puede formar parte de al menos ciertas subfracciones de cualquier clase de lipoproteínas. En humanos existe un polimorfismo en el gen de la apo E, siendo las principales isoformas de esta proteína la E2, la E3 – la más abundante - y la E4. Dicho polimorfismo constituye uno de los principales determinantes genéticos del perfil lipoproteico y el riesgo cardiovascular en la población general, así como del riesgo de enfermedad de Alzheimer a edades avanzadas, todos los cuales son más desfavorables en los portadores de la isoforma E4 [208]. Además, varios estudios han asociado distintos defectos en la apo E con dislipemias y elevación del riesgo cardiovascular [209], como queda constatado, por ejemplo, en ratones *knockout* para la apo E, los cuales desarrollan hipercolesterolemia y aterosclerosis incluso con una dieta normal [210, 211]. La apo E cumple diversas funciones que la hacen ateroprotectora. De ellas, la más importante es la de propiciar la eliminación de las lipoproteínas remanentes y de las IDL por el hígado, tanto a través del rLDL como del LRP (apartado 4.2). Además, se ha descrito que *in vitro* activa la LCAT y la HL e inhibe la LPL [45]. En relación con el tema que ahora nos ocupa, la apo E estimula la salida de colesterol desde el macrófago.

Se han propuesto dos mecanismos por los cuales la apo E contribuye a la salida del colesterol celular [212]. En el primero, partículas que contienen apo B y apo E, como las VLDL, son reconocidas y captadas por el rLDL. Después de la endocitosis, la partícula se desintegra en el endosoma temprano y el núcleo lipídico y la apo B son dirigidas al lisosoma mientras que el rLDL y la apo E son reciclados a la MP. Aquí, la apo E intacta se asocia a colesterol y vuelve a secretarse al medio contribuyendo así a la salida de este lípido de la célula [212, 213]. De hecho, la apo E4 posee un reciclaje deficiente en relación a la apo E3, el cual se asocia a una menor exportación y la acumulación intracelular de colesterol [214]. El otro mecanismo por el cual la apo E contribuye a la salida del colesterol celular implica a la apo E endógena de ciertas células como los macrófagos y los adipocitos. Así, en respuesta a un aumento en el contenido celular de colesterol se sintetiza apo E, también diana de LXR, y la cual se secreta asociada a dicho lípido. En este caso, al igual que ocurre con la apo A-I, en el medio extracelular dicha partícula con apo E puede recibir más colesterol y fosfolípidos a través de ABCA1 para formar una HDL naciente (γ LpE) que luego será enriquecida con colesterol por acción de ABCG1 y que puede fusionarse con las HDL que contienen apo A-I [45, 212, 215].

4.2. Transporte de colesterol al hígado y excreción en heces

Se denomina transporte reverso de colesterol (TRC) al proceso por el cual las HDL estimulan la salida de colesterol de los tejidos periféricos, lo transportan en el plasma y facilitan su captación por el hígado para su excreción en la bilis [54]. Muchos estudios *in vivo* han medido

el TRC centrípeto, es decir, teniendo en cuenta la contribución de todos los tejidos extrahepáticos. Utilizando ratones manipulados genéticamente se ha determinado que ni la deficiencia de apo A-I, ni el aumento de expresión de la CETP o CLA-1/SR-BI, a pesar de disminuir las concentraciones de colesterol-HDL, afectan el TRC desde los tejidos extrahepáticos [216]. De igual modo, el transporte hepatobiliar en ratones deficientes en ABCA1 no está afectado [216]. En humanos, por el contrario, la infusión de complejos a base de proapo A-I y fosfolípidos incrementa la excreción fecal de esteroides, lo que sugiere la estimulación del TRC [217]. Todo ello indica que el TRC es un proceso complejo cuyos principales determinantes no se han esclarecido. Por otro lado, estos estudios no reflejan la contribución del colesterol proveniente del macrófago al total del colesterol transportado. Esta contribución, aunque es minoritaria, se considera de gran importancia, dado el papel de aquellas células en la aterosclerosis. Es por ello que se han desarrollado modelos para el estudio del TRC específicamente desde los macrófagos en animales [218]. Así, se ha documentado que este último parámetro se correlaciona mejor con la incidencia de aterosclerosis en el ratón que la concentración de HDL [156, 216]. A este TRC desde el macrófago (Esquema 3), por su relevancia patofisiológica, es al que nos referiremos a continuación.

Como se ha expuesto más arriba, el primer producto de la salida del excedente de colesterol celular son las pre β_1 -HDL. La adquisición adicional de colesterol y fosfolípidos por estas partículas más la esterificación del colesterol mediante la acción de la LCAT propician su transformación progresiva en pre β_2 -HDL, pre β_3 -HDL y partículas maduras α -HDL₃ y α -HDL₂ [46]. Como ya se ha comentado, en este proceso son fundamentales los transportadores ABCA1 y ABCG1. En modelos de ratón en los que se ha determinado el TRC desde los macrófagos, cuando aumenta la expresión de ABCA1 o ABCG1, aumenta el TRC, y, por contra, la supresión de estas moléculas tiene un efecto negativo sobre el TRC [209, 216, 219-221]. El grado de expresión de la apo A-I, pero no así el de apo A-II [222], también condiciona el TRC desde los macrófagos en el ratón. Así, una elevada expresión de apo A-I incrementa dicho transporte, mientras que una deficiencia de la misma lo disminuye [216, 218]. Estas observaciones ponen de manifiesto que el aumento de la disponibilidad de apo A-I, componente esencial de las HDL y aceptor del colesterol celular exportado por ABCA1, promueve el TRC desde los macrófagos.

La apo E contribuye al TRC no solo estimulando la salida del colesterol celular sino también mediando la captación hepática de las lipoproteínas que la contienen. Estudios recientes han descrito el papel clave que tiene la apo E sintetizada por los macrófagos. Así, en ratones *knockout* para apo E se ha observado una disminución considerable de la salida del colesterol desde los macrófagos *in vitro*. En ratones con apo E pero cuyos macrófagos carecían de esta molécula, disminuía la movilización del colesterol hacia el plasma, hígado y heces. Por el contrario, la expresión de apo E exclusivamente en los macrófagos del animal deficiente en apo E era suficiente para normalizar el TRC [209].

Otro paso del TRC es la salida de las HDL del espacio intersticial al plasma. En este proceso se ha implicado la vasculatura linfática y más concretamente la captación y transición de las HDL mediada por los SR-BI expresados en el endotelio linfático [223, 224]. El siguiente paso crucial en el TRC es la entrega del colesterol de las HDL al hígado. Este proceso se puede realizar por dos vías alternativas (Esquema 3), una mediada directamente por las HDL y otra indirecta. En la primera, la partícula de HDL se une al receptor CLA-1/SR-BI y le cede el colesterol, esterificado

o libre, selectivamente, sin llegar la partícula a ser captada por la célula [104]. Otra posibilidad de la vía directa comprende la captación de las partículas de HDL que contienen apo E, las cuales son minoritarias en humanos pero no en ratones, a través del rLDL, mediante la unión de la apo E a este receptor [59]. Sin embargo, tampoco en el ratón este mecanismo parece ser cuantitativamente tan importante como el mediado por CLA-1/SR-BI.

En el hígado, los hepatocitos son los responsables del 88% de la captación de los ésteres de colesterol procedentes de las HDL [89]. Estudios realizados en ratones *knockout* para CLA-1/SR-BI han mostrado que en estos animales se produce un aumento significativo de la concentración plasmática de colesterol-HDL [225] y una reducción del 80 % en la captación hepática de ésteres de colesterol de las HDL, todo ello acompañado de aterosclerosis severa [107, 108]. Por el contrario, la sobreexpresión de dicho gen llevó a la práctica desaparición del colesterol-HDL y redujo sustancialmente la aterosclerosis [107, 108, 226]. En consonancia con estos resultados, la expresión hepática de CLA-1/SR-BI está directamente correlacionada con el TRC desde el macrófago, ya que el aumento de aquélla incrementa la cantidad de colesterol en heces, y su deficiencia la disminuye [227]. Se ha descrito que existe una cooperación funcional entre la HL y CLA-1/SR-BI en la cesión del colesterol de las HDL al hepatocito. Así, la hidrólisis de los triglicéridos y fosfolípidos mediada por dicha lipasa facilita la interacción de la HDL con CLA-1/SR-BI y la consiguiente cesión del colesterol a la célula [59].

A pesar de tener CLA-1/SR-BI una importancia evidente en ratón, en humanos no se habían caracterizado mutaciones de CLA-1/SR-BI que se asociasen a una alteración significativa en la concentración de HDL. Este panorama ha cambiado muy recientemente con la identificación de una mutación puntual con pérdida de función que se asociaba a altas concentraciones de colesterol-HDL y disminución de la salida de colesterol de los macrófagos *in vitro*, aunque sin incremento de la aterosclerosis. Por otra parte, la función plaquetaria estaba alterada y la esteroidogénesis adrenal estaba disminuida [228]. Estos resultados han sido apoyados por la posterior identificación de otras dos mutaciones que resultaban en concentraciones altas de colesterol-HDL [229].

En la vía indirecta de cesión del colesterol de las HDL al hígado, las HDL, por mediación de la CETP, ceden colesterol, intercambiándolo por triglicéridos, a lipoproteínas que contienen apo B (quilomicrones, VLDL, IDL y LDL), que son posteriormente captadas por las células hepáticas a través de rLDL, contribuyendo así estas partículas al TRC. Estudios cinéticos indican que esta vía es ampliamente mayoritaria en humanos [59, 230]. Sin embargo, no tiene lugar en el ratón, especie que carece de CETP.

Existe una tercera vía de captación del colesterol-HDL en el hígado (Esquema 3) y es a través de la cadena β de la ATP sintasa, una proteína de la membrana interna de la mitocondria que puede tener una localización ectópica en la superficie de los hepatocitos. Este receptor reconoce la apo A-I y su unión a ella estimula la endocitosis de la partícula de HDL (completa) por un mecanismo dependiente de la generación de ADP [231]. Posteriormente se comprobó que el receptor acoplado a proteínas G P2Y₁₃ estaba implicado en este mecanismo [232].

Las remodelaciones que sufren las HDL en el hígado permiten, además de la cesión de colesterol a los hepatocitos, regenerar partículas que pueden aceptar nuevamente colesterol celular, promoviéndose por tanto el reinicio del TRC (Esquema 3). Así, la lipólisis mediada por la

HL supone una reducción del tamaño de partícula y el desprendimiento concomitante de apo A-I de su superficie, posiblemente integrada en partículas del tipo pre β ₁-HDL. La acción de la CETP favorece, aunque de manera indirecta, el proceso anterior, ya que enriquece el núcleo de las HDL en triglicéridos, sustrato éstos de la HL. La captación selectiva de colesterol a través de CLA-1/SR-BI también reduce el tamaño de la partícula de HDL, que, empobrecida en lípidos, es capaz de volver a tomar colesterol de los tejidos extrahepáticos. Además de las anteriores, se han propuesto otras moléculas que promueven la formación de pre β -HDL, tales como la apo M o la PLTP, que pertenece a la familia de la CETP. La PLTP transfiere fosfolípidos entre las distintas HDL, causando el aumento del tamaño de éstas, de manera que acaban fusionándose y liberando pre β -HDL [59].

El último paso en el TRC es la excreción hepatobiliar e intestinal del colesterol, previa conversión en ácidos y sales biliares, o bien como tal (Esquema 3). En este último proceso son fundamentales los transportadores ABCG5/G8, que se localizan tanto en la membrana del canalículo biliar en los hepatocitos como en la membrana apical de los enterocitos (apartado 4.1.3). La deficiencia de estas moléculas causa un descenso en la eliminación biliar de esteroides vegetales y colesterol [160], mientras que la inducción de su expresión mediante la administración de un activador de LXR aumenta el contenido de esteroides en heces [233].

Por otra parte, estudios que han comprobado la importancia de ABCG5 y ABCG8 en la excreción hepatobiliar de colesterol han encontrado también una vía de excreción totalmente independiente del hígado [234]. En esta vía, denominada transporte transintestinal de colesterol, la parte proximal del intestino delgado es capaz de excretar colesterol activamente [235, 236]. Esta ruta, de la que se habían ido acumulando evidencias desde hace décadas [237], rompe con el paradigma de Glomset [238], quien acuñó el término de transporte reverso de colesterol y según el cual el colesterol debía ser entregado necesariamente al hígado para su excreción.

5. Regulación de la homeostasis del colesterol

A su papel esencial en la estructura y fisiología celular, el colesterol une un efecto tóxico cuando se encuentra en exceso, todo lo cual determina la necesidad de un estricto control de sus concentraciones celulares. La homeostasis del colesterol en las células de los vertebrados está regulada principalmente por tres familias de factores de transcripción denominados SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) [239], LXR [240] y PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) [46]. No obstante, SREBP, LXR y PPAR también intervienen en el control del metabolismo de los ácidos grasos, propiciando la regulación coordinada con el metabolismo del colesterol. Adicionalmente, determinados miRNA participan en la regulación postranscripcional de muchas de las moléculas implicadas en el metabolismo de los lípidos [241]. En este apartado nos referiremos al papel de cada uno de estos actores en la regulación de la homeostasis del colesterol.

5.1. *SREBP-Scap-Insig*

Los factores de transcripción SREBP, pertenecientes a la familia *basic helix-loop-helix leucine zipper*, se encuentran unidos a las membranas del RE y su función es activar la expresión de más de 30 genes dedicados a la captación de colesterol y a la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos [239]. Las células de mamíferos producen tres isoformas de SREBP llamadas SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 [239]. SREBP-1a y -1c provienen del mismo gen (SREBF1), que por el uso de diferente promotor y ajuste alternativo da lugar a los distintos transcritos. Los tres SREBP, de aproximadamente 125 kDa, poseen en la membrana del RE una conformación en forma de horquilla, con la región NH₂-terminal, que contiene el factor de transcripción, y la región COOH-terminal, reguladora, inmersa en el citoplasma. Estas regiones están separadas por dos hélices transmembrana que flanquean a un pequeño lazo que se encuentra en el lumen del RE. Inmediatamente después de su síntesis los SREBP se unen a la proteína Scap (*SREBP cleavage-activating protein*) en la membrana del RE por interacción de la región COOH-terminal del SREBP con la región COOH-terminal de Scap [242]. Scap está embebida en las membranas del RE por su región NH₂-terminal, compuesta por ocho hélices transmembrana separadas por lazos hidrofílicos. Las hélices dos a seis comprenden un dominio sensor de esteroides [243, 244]. Cuando aumenta el colesterol en las membranas del RE el esteroide se une a Scap en dicho dominio, provocando un cambio de conformación que favorece su interacción con las proteínas Insig (*insulin-induced gene*) [245, 246].

Insig-1 e Insig-2 son proteínas integrales del RE, responsables de mantener a Scap retenida en este orgánulo. Las proteínas humanas Insig-1 e Insig-2 contienen 277 y 225 aminoácidos respectivamente. Ambas son extremadamente hidrofóbicas, dado que casi el total de su secuencia consiste en seis hélices transmembrana unidas por lazos cortos hidrofóbicos y solo proyectan al citoplasma secuencias cortas de los extremos NH₂-terminal y COOH-terminal [247]. Ambas Insig tienen la capacidad de unirse a Scap en presencia de colesterol y así retener el complejo Scap/SREBP en el RE [245, 248]. Sin embargo, Insig-1 e Insig-2, que se expresan mucho en hígado, presentan una regulación diferencial. Insig-1 es una diana obligada de SREBP y la insulina incrementa su expresión mediante la inducción de SREBP-1c, mientras que Insig-2 no está regulada por SREBP y la insulina reprime su expresión [248, 249].

Cuando la célula se empobrece en colesterol, el complejo Scap/SREBP se disocia de Insig y sale del RE en vesículas recubiertas de proteínas COPII para viajar al aparato de Golgi [250-253]. La formación de estas vesículas está mediada por la unión de Sec24, componente de un complejo de proteínas COPII también formado por Sar-1 y Sec23, al hexapéptido MELADL del lazo citoplasmático entre las hélices 6 y 7 de Scap [252]. Una vez en el complejo de Golgi, SREBP es escindida secuencialmente por dos proteasas residentes, S1P y S2P (*site-1/2 protease*), liberándose el extremo NH₂-terminal de SREBP, de 68 kDa, que constituye el factor de transcripción activo (nSREBP). Este fragmento viaja al núcleo, donde se une a los promotores de los genes que cuentan con secuencias SRE (*sterol regulatory element*), activando su transcripción [254].

Las tres SREBP tienen efectos diferenciales sobre la expresión génica [249, 254]. SREBP-2 activa la transcripción de muchos de los genes de las enzimas de la colesterogénesis y el del rLDL, por lo que aquél favorece la síntesis y captación de colesterol. SREBP-1c activa la

transcripción de los genes de las enzimas necesarias para convertir acetil-CoA en ácidos grasos insaturados de cadena larga, la incorporación de ácidos grasos a triglicéridos y fosfolípidos y la producción del NADPH requerido en la síntesis de colesterol y ácidos grasos. SREBP-1a, por su parte, activa tanto los genes de la biosíntesis de colesterol como los de la lipogénesis [254]. Además, las propias SREBP son dianas de estos factores de transcripción. La eficiencia de la activación de la transcripción depende de la interacción de SREBP con factores de transcripción adicionales como NF-Y o Sp1, y con el coactivador CREB [255]. Sin embargo, se han descrito varios genes como el de la MTP [256], LRP [257] o caveolina-1 [258] cuya transcripción es inhibida por los SREBP.

Cuando se disocia del complejo Scap/SREBP, Insig-1, cuya vida media es menor a 30 minutos, es ubiquitinada y degradada en el proteosoma [259]. Dado que Insig-1 también es diana de SREBP, ésta activa la transcripción de aquella. Sin embargo, Insig-1 será degradada rápidamente a menos que haya suficiente colesterol para estabilizar su unión a Scap. De este modo, el mRNA de Insig-1, de manera recíproca a la proteína, aumenta cuando hay deficiencia de colesterol en la célula y disminuye cuando se acumula colesterol. Por ello, el bloqueo del procesamiento de SREBP requiere la convergencia de nuevo suministro de colesterol (de síntesis o captación) y síntesis *de novo* de Insig-1 [259]. Es lo que se conoce como inhibición convergente del procesamiento de SREBP, la cual podría constituir un mecanismo para que no se interrumpa esta vía antes de que se haya repuesto el suficiente colesterol [249].

Otros esteroides, como, por ejemplo, el desmosterol, también son eficaces inhibiendo el procesamiento de SREBP [22, 260] mediante su unión a Scap y consiguiente interacción de ésta con Insig [260]. Por su parte, los oxiesteroides oxidados en la cadena lateral (22(R)-, 24-(S), 25- y 27-hidroxicolesterol y 24(S),25-epoxicolesterol) son potentes inhibidores de la vía de SREBP, pero en este caso consiguen ese efecto mediante su unión a Insig, no a Scap [246, 260].

5.1.1. *Papel de Insig en la degradación de la HMGCoAR controlada por esteroides*

La HMGCoAR es la enzima limitante en la biosíntesis de colesterol. Así, está sujeta a un extraordinario grado de regulación para mantener un flujo suficiente de sustratos para la síntesis de isoprenoides no esteroídicos y también para controlar la sobreproducción de colesterol y precursores potencialmente tóxicos [24]. A nivel transcripcional, la expresión de esta enzima está controlada por los SREBP en función del contenido celular de colesterol por el mecanismo antes descrito. A nivel postranscripcional la HMGCoAR está regulada mediante degradación acelerada cuando se acumulan esteroides, proceso también regulado por Insig [261].

La HMGCoAR está unida a la membrana del RE a través de su región NH₂-terminal, que contiene ocho hélices transmembrana [262]. Las hélices dos a seis comprenden un dominio sensor de esteroides [243, 244, 263] similar al de otras moléculas también comentadas en esta Introducción (Scap, NPC1, NPC1L1, esteroide Δ^7 -reductasa y Patched). El extremo COOH-terminal se proyecta al citoplasma y contiene el dominio catalítico [264]. El hecho de que la HMGCoAR esté anclada a la membrana es relevante para su regulación [265]. En células con deficiencia de colesterol, HMGCoAR posee una vida media que excede las 12 h. Cuando se acumula colesterol y otros isoprenoides, la enzima se degrada rápidamente, con una vida media de menos de 1 h. La

degradación está mediada exclusivamente por el dominio de unión a la membrana [265]. Curiosamente, el colesterol es un inductor débil de la degradación de la HMGCoAR, pero sus precursores lanosterol y dihidrolanosterol son mucho más potentes [266]. La degradación acelerada comienza cuando estos esteroides se acumulan en las membranas del RE, lo cual induce la unión de la HMGCoAR a Insig [249], para lo que se requiere la secuencia YIYF en el dominio sensor de esteroides de la enzima [263]. Curiosamente, la primera tirosina de esta secuencia es equivalente a la tirosina 298 de Scap, requerida para la unión de Scap con Insig [244, 245]. Como Scap, HMGCoAR puede unirse a Insig-1 y a Insig-2 [263].

El proceso de degradación de la HMGCoAR se inicia cuando la adición del esteroide induce la unión de la enzima a Insig, lo cual promueve la transferencia de ubiquitina a las lisinas 89 y 248 de la enzima mediante gp78. La ubiquitinación marca a la HMGCoAR para que sea reconocida por VCP, que la extrae de la membrana del RE y la entrega al proteosoma para su degradación [249, 267]. La extracción completa y degradación de la HMGCoAR ubiquitinada requiere un isoprenoide no esteroídico derivado del mevalonato, el geranilgeraniol, lo que sugiere la posibilidad de la participación de proteínas Rab, que están geranilgeraniladas, en este proceso [263, 267].

Los oxisteroides también estimulan la ubiquitinación y degradación de la HMGCoAR, y lo hacen mediante su unión a Insig; según se ha propuesto por analogía a la regulación del procesamiento de los SREBP por oxisteroides [260, 268]. Por lo tanto, la interacción de los oxisteroides con esta proteína del RE reprime la biosíntesis de colesterol por un doble mecanismo: la activación de la degradación de la HMGCoAR y la inhibición de la vía de SREBP.

5.2. LXR

LXR α y LXR β , también conocidos como NR1H3 y NR1H2 respectivamente fueron primero considerados como receptores nucleares huérfanos hasta que se descubrió que los oxisteroides se unían a ellos y los activaban a concentraciones fisiológicas [43]. Entre estos oxisteroides se cuentan el 20(S)-, 22(R)-, 24(S)- y 27-hidroxicolesterol y el 24(S),25-epoxicolesterol [44]. De ellos, el agonista más potente es el 24(S),25-epoxicolesterol. Los esteroides intermediarios insaturados en C-24 desmosterol y, en menor grado, zimosterol, también son capaces de activar a LXR [269]. Sin embargo, el colesterol no es un ligando del mismo [44]. LXR α está altamente expresado en el hígado y en menor grado en las glándulas adrenales, intestino, tejido adiposo, macrófagos, pulmón y riñón, mientras que LXR β tiene una distribución ubicua [270]. Los LXR son factores de transcripción que forman heterodímeros permisivos con el receptor X de retinoides (RXR) (activado por el ácido 9-cis retinoico), es decir, el complejo puede ser activado por ligandos de cualquiera de los dos componentes del dímero. El complejo LXR/RXR se une en el DNA a los elementos de respuesta a LXR (LXRE) que consisten en repeticiones directas de la secuencia AGGTCA separadas por 4 nucleótidos [271]. Al igual que muchos otros receptores nucleares que forman heterodímeros con RXR, los LXR residen en el núcleo, unidos a las secuencias LXRE y acoplados con correpresores. En ausencia de ligando, los LXR se mantienen en interacción con los correpresores y la actividad transcripcional sobre sus genes diana está reprimida. La unión del ligando resulta en un cambio conformacional que favorece el intercambio de correpresores por coactivadores y la activación de la transcripción de los genes diana [240]. La unión del ligando a LXR también inhibe la transcripción de los promotores de ciertos genes,

como, por ejemplo, citoquinas proinflamatorias, que no contienen LXRE, mediante un proceso denominado transrepresión [240]. Este mecanismo da cuenta de las acciones antiinflamatorias que también ejerce dicho receptor. Un aspecto interesante en la regulación de LXR es que la activación de LXR α en macrófagos humanos es capaz de inducir su propia transcripción en lo que constituye un mecanismo de amplificación de la respuesta. Esta amplificación no ocurre, sin embargo, en macrófagos de roedores [272, 273].

Los LXR actúan como sensores de colesterol; cuando en las células se acumulan oxiesteroles como resultado de un incremento en las concentraciones de colesterol, LXR induce la transcripción de genes que protegen a la célula frente a la sobrecarga del mismo. LXR regula múltiples procesos como el TRC, la biosíntesis y excreción de los ácidos biliares, la biosíntesis de colesterol, la captación de colesterol a través del rLDL y la absorción y excreción de colesterol en el intestino. Además, controla la lipogénesis, en parte a través de la inducción de SREBP-1c, lo que le confiere un papel relevante en la generación de sustratos energéticos [249, 274].

5.2.1. Regulación de la biosíntesis y captación celular de colesterol

La activación de LXR inhibe simultáneamente la síntesis y captación de colesterol. Recientemente, se ha demostrado que LXR α reprime la expresión de dos genes, *FDFT1* (escualeno sintasa) y *CYP51A1* (lanosterol 14 α -desmetilasa), que codifican enzimas clave de la ruta de biosíntesis del colesterol. En los promotores de estos genes se han identificado “LXRE negativos” que median, en lugar de activación, represión tras la unión de LXR [275]. Basándose en esta observación se ha propuesto que LXR α juega un papel importante en la represión de la biosíntesis del colesterol que inducen los oxiesteroles.

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de LXR resulta en la disminución de la captación de colesterol a través del rLDL. Ello no se explica por una alteración en la cantidad de mRNA del rLDL, sino por una disminución de la cantidad de proteína. Este efecto está mediado por la proteína Idol, cuya expresión aumenta por efecto de la activación de LXR tanto en ratones como en humanos [76, 276]. El modelo más simple propuesto para la acción de Idol es que éste se une a la cola citoplasmática del rLDL, donde cataliza la ubiquitinación del receptor marcándolo así para su degradación [76]. Como se mencionó arriba (apartado 2.2), además del rLDL, otros dos miembros de su familia, el rVLDL y el apo ER2, son dianas de Idol [277].

La activación de LXR por oxiesteroles lleva a una reducción drástica de la cantidad de proteína del rLDL en la MP en tiempos tan cortos como 2 h [278]. Aunque los esteroides pueden disminuir la cantidad de rLDL mediante la inhibición de la vía de SREBP y, así, de la transcripción del gen, se ha observado que en células carentes de Idol la disminución de la cantidad de rLDL es mucho más lenta [278]. Idol podría, por tanto, participar en un mecanismo de respuesta rápida ante una sobrecarga de colesterol. Por otra parte, se ha comprobado que PCSK9 e Idol son parte de mecanismos independientes y complementarios que actúan sobre los mismos sustratos [278]. PCSK9 induce la degradación del rLDL uniéndose a uno de sus dominios extracelulares, mientras que Idol actúa desde el interior celular [76]. Además, se conoce que PCSK9 actúa fundamentalmente en el hígado y su alteración tiene importantes efectos sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol [279]. Idol, por su parte, se expresa más en las células

de los tejidos periféricos, como los macrófagos, sugiriendo que su función biológica fundamental es prevenir la captación excesiva de colesterol por dichos tejidos [76].

5.2.2. Regulación del transporte reverso de colesterol

Muchas de las moléculas implicadas en el TRC son dianas de LXR (apartado 5.2). Así, LXR promueve la exportación del colesterol en los tejidos periféricos mediante ABCA1, ABCG1 y apo E [280-282], el transporte de ese colesterol hasta el hígado mediante CETP y PLTP [59] y, finalmente, la excreción del colesterol desde el hepatocito al canalículo biliar mediante ABCG5 y ABCG8 [283]. Además, en el ratón la colesterol 7 α -hidroxilasa, enzima clave en la síntesis de ácidos biliares, es diana de LXR [284]. En consonancia con ello, estudios *in vivo* en los que se ha activado a LXR mediante la administración de agonistas o bien con dietas ricas en colesterol han demostrado un aumento significativo en el TRC [233, 285].

Dado que LXR promueve la exportación de colesterol celular, cuando la célula requiere colesterol, LXR debe inactivarse. Así, para la proliferación de células T se requiere la inactivación de LXR β (y promoción de la vía de SREBP), efecto que estaría mediado por la inducción de la expresión de SULT2B1 (sulfotransferasa 2B1), que inactiva los oxisteroles mediante sulfatación [286]. Recíprocamente, la activación de LXR con un agonista resulta en un aumento de la exportación de colesterol y la inhibición de la proliferación de células mieloides [287].

Además de la apo E, LXR induce la expresión de otras apolipoproteínas, como las del *cluster* de genes APOC (APOC1, APOC2 y APOC4) en macrófagos [288] y la de APOD en tejido adiposo [289]. Hasta ahora se desconoce el significado fisiológico de estos efectos, aunque se cree que dichas apolipoproteínas también puedan participar en el TRC. Más recientemente, se ha demostrado que APOA4 es una diana directa de LXR en el hígado, pero no en el intestino, de ratón, así como en la línea celular humana HepG2 [290]. Por otro lado, APOA5 es el único gen de una apolipoproteína que se conoce es reprimido por LXR [291], si bien la represión de APOA5 hepático por LXR no parece ser directa sino secundaria a la inducción de SREBP-1c [240]. Como la apo A-V, producto de dicho gen, estimula el catabolismo de los triglicéridos plasmáticos [292], la represión por LXR puede contribuir a los efectos hipertrigliceridémicos de los agonistas sintéticos de LXR [293].

5.2.3. Regulación del metabolismo de ácidos biliares y la absorción intestinal del colesterol

La primera diana directa de LXR α en ser identificada fue CYP7A1. Este gen codifica una proteína que es miembro de la familia de enzimas del citocromo P450 y cataliza el paso limitante en la ruta de síntesis de los ácidos biliares. Estudios en ratones genéticamente deficientes en LXR α (LXR α ^{-/-}) alimentados con una dieta rica en colesterol han demostrado que estos animales no pueden inducir la expresión hepática del gen Cyp7a1 ni, por tanto, convertir el colesterol en ácidos biliares, lo que resulta en la acumulación hepática de ésteres de colesterol [294]. Curiosamente, el elemento LXRE que se encuentra en el promotor de Cyp7a1 en roedores no está conservado en humanos [295]. LXR β también se expresa en hígado, pero los ratones LXR β ^{-/-} no presentan un fenotipo hepático particular incluso con una dieta rica en colesterol, lo que

indica que LXR α es la isoforma relevante en este tejido en lo que al control de la síntesis de ácidos biliares se refiere [296].

LXR también juega un papel en la eliminación de los ácidos biliares. Estudios recientes han descrito que la activación de LXR α aumenta la expresión del gen UGT1A3 a través de su unión a una secuencia similar a LXRE de su promotor [297]. UGT1A3 es una de las enzimas más activas en la conjugación de los ácidos biliares con ácido glucurónico, lo que permite la conversión de los primeros en metabolitos excretables en la orina. Basándose en esta observación, se ha propuesto que LXR α podría facilitar la excreción de colesterol en forma de ácidos biliares glucuronidados [274].

5.3. PPAR

Los PPAR son receptores nucleares, de los que existen tres tipos: α (NR1C1), δ/β (NR1C2) y γ (NR1C3). Éstos tienen una distribución tisular diferencial: PPAR α se expresa principalmente en el hígado, riñón, corazón y músculo, PPAR γ en el tejido adiposo y PPAR δ/β es ubicuo. Los PPAR son activos reguladores del metabolismo energético, especialmente el de los ácidos grasos, y la inflamación [298, 299]. Existen múltiples ligandos naturales para los PPAR, principalmente ácidos grasos poliinsaturados y derivados de éstos. Recientemente, se ha identificado a 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina como ligando endógeno de PPAR α [300]. Además, diversos compuestos sintéticos activan selectivamente a los diferentes PPAR. Entre ellos pueden destacarse los fibratos, activadores de PPAR α que son utilizados en el tratamiento de la hipertrigliceridemia, y las tiazolidinedionas o glitazonas, activadoras de PPAR γ y efectivas en el tratamiento de la resistencia a la insulina. Los PPAR forman dímeros con RXR que se unen a elementos de respuesta (PPRE) en el promotor de sus genes diana, los cuales consisten en una repetición directa de la secuencia consenso AGGTCA separada por uno o dos nucleótidos [298, 301].

Los PPAR también regulan la homeostasis del colesterol. Así, los agonistas de PPAR α y PPAR γ reducen la biosíntesis de colesterol, efecto asociado a una disminución de la expresión de SREBP-2. En consonancia con ello, dichos fármacos incrementan la expresión de Insig-1, en cuyo gen se ha identificado un PPRE para PPAR γ [302]. Sin embargo, se han observado efectos discordantes con éstos, ya que la activación de PPAR γ en los macrófagos THP-1 aumenta la expresión de la HMG-CoA sintasa y la HMGCoAR, dianas de SREBP-2 [46, 303]. Por su parte, la activación de PPAR δ/β también induce la expresión de Insig-1 en células HepG2, si bien aquí reduce la cantidad de nSREBP-1, pero no altera la expresión de genes diana de SREBP-2 [302].

La administración de fibratos a humanos causa un aumento del 5-15% en la concentración plasmática de colesterol-HDL. En correspondencia con ello, en hepatocitos humanos, pero no así en los de roedores, los fibratos incrementan la expresión de la apo A-I, cuyo gen contiene un PPRE [302].

La expresión de CD36 por el macrófago aumenta tras la captación de LDL-Ox, proceso que está mediado por la activación de PPAR γ [98]. Sin embargo, esto no resulta en la acumulación celular de colesterol, puesto que, simultáneamente, se induce la expresión de ABCA1, ABCG1 y apo E, dianas de LXR, y, así, la exportación de colesterol. En efecto, el gen de LXR α , no así el de LXR β , es diana directa de PPAR α y PPAR γ [179, 180]. No obstante, se ha descrito que parte del efecto de PPAR γ sobre ABCG1 es independiente de la inducción de LXR [194]. La activación de

PPAR δ/β también estimula la expresión de ABCA1 y la exportación del colesterol celular, lo que pudiera relacionarse con el aumento que aquél causa en el colesterol-HDL plasmático [46].

La activación de PPAR α y PPAR γ incrementa, además, la expresión de CLA-1/SR-BI en monocitos y en macrófagos y, de hecho, en las lesiones ateroscleróticas humanas dichos receptores nucleares y CLA-1/SR-BI se localizan conjuntamente [46]. También en macrófagos humanos, PPAR γ estimula la expresión de CYP27A1, que contiene un PPRE en su promotor [302] y cuyo producto convierte el colesterol en 27-hidroxicolesterol. Por lo tanto, los PPAR pueden promover la eliminación del colesterol celular mediante diversos mecanismos. Ello se correlaciona con su efecto inhibidor de la aterogénesis [194].

5.4. *MicroRNAs*

Los micro RNA (miRNA) son RNA pequeños (~22 nucleótidos), de cadena doble, no codificantes, que están codificados en el genoma de la mayoría de las células eucariotas y en algunos virus [241]. Los miRNA se unen a sitios complementarios de la región 3' no traducida (3' UTR) de los mRNA, causando la represión de la traducción y/o la desestabilización del transcrito. Un único miRNA puede tener múltiples dianas, lo que provee de un mecanismo para el control postranscripcional simultáneo de un conjunto de genes relacionados con una vía metabólica o un proceso fisiológico determinado [241]. Hasta el momento se han descubierto varios miRNA que regulan el metabolismo lipídico, entre los que se encuentran miR-122, miR-370, miR-378/378*, miR-335, miR-125a-5p, miR-33, miR-758 y miR-144. El miR-122 fue inicialmente identificado como un miRNA muy abundante en el hígado, representando el 70 % del total de la expresión de miRNA en este órgano [304]. Se encuentra alterado en la infección por el virus de la hepatitis C [305] y en el carcinoma hepatocelular [241]. Se ha propuesto que su función es mantener el fenotipo del hígado, además de regular la síntesis de colesterol y la oxidación de ácidos grasos [306]. Así, la inhibición de miR-122 produce una reducción de la concentración plasmática de colesterol y de la biosíntesis hepática de colesterol y ácidos grasos, a la vez que un aumento en la oxidación de estos últimos [306]. Por otra parte, el aumento de expresión de miR-122 lleva a un aumento de expresión de los genes lipogénicos, incluido el de SREBP-1c [307]. El miR-370 tiene efectos similares al miR-122 sobre el metabolismo lipídico y, por otro lado, la transfección de la línea de hepatocitos HepG2 con miR-370 aumenta la expresión de miR-122 [307]. El miR-378/378* junto con miR-143, miR-27 y miR-335, se ha asociado a la regulación del metabolismo de lípidos y la diferenciación de adipocitos [308-311].

El miR-33a se localiza en el intrón 16 del gen SREBF2, que codifica SREBP-2, y juega un papel clave en la regulación postranscripcional del metabolismo lipídico [182, 183, 312]. Varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que el miR-33a se expresa conjuntamente con SREBF2 y que, por tanto, aumenta su expresión en respuesta a la deficiencia de colesterol [182, 183, 312]. La presencia de miR-33a está altamente conservada desde mamíferos hasta *Drosophila*. Sin embargo, se ha identificado otra isoforma de miR-33, el miR-33b, que se encuentra en el intrón 17 del gen SREBF1 de humanos, pero no en el de ratón [183].

Entre las dianas de miR-33 se encuentra ABCA1, cuya región 3' UTR contiene tres sitios de unión, muy conservados, para miR-33a y/o miR-33b. De hecho, miR-33 reprime intensamente la expresión de ABCA1 [182, 183, 312]. Así, la sobreexpresión de miR-33 en macrófagos resulta en la disminución de la cantidad de ABCA1 y de la salida de colesterol hacia apo A-I, mientras que la

inhibición del miR-33 endógeno produce los efectos contrarios [182, 183, 312]. Además, se han identificado a ABCG1 [182, 312] y NPC1 [182] como dianas de miR-33. En el genoma del ratón la región 3' UTR de *Abcg1* contiene dos sitios de unión para miR-33; sin embargo, estos sitios no están conservados en humanos. Esto resulta en la inhibición de la expresión de ABCG1 y la disminución de la exportación de colesterol hacia HDL por miR-33 en macrófagos de ratón, pero no en humanos [182, 312]. Por su parte, la región 3' UTR del gen de NPC1 en humanos contiene dos sitios de unión para miR-33, mientras que el mismo gen de ratón solo contiene uno [182]. NPC1 puede actuar conjuntamente con ABCA1 para exportar el colesterol lisosomal hacia apo A-I [313] (apartado 4.1.1), lo que indica que miR-33 puede reprimir también un paso intracelular de la vía de exportación del colesterol captado por la célula. En su conjunto, estos resultados sugieren que, en respuesta a una disminución del contenido celular de colesterol y consiguiente aumento de la transcripción de SREBF2, miR-33 reduce la exportación de colesterol a través de la regulación coordinada de ABCA1, ABCG1 y NPC1 [241].

Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de miR-33, al aumentar las concentraciones de ABCA1, tiene como consecuencia el aumento de la concentración de las HDL circulantes [182, 183, 312]. Estas observaciones se realizaron tanto con ratones alimentados con dieta normal como con ratones alimentados con una dieta rica en grasas, indicando que incluso cuando es previsible, como en el segundo caso, que las concentraciones de miR-33 sean bajas, la inhibición de miR-33 aún puede resultar en un aumento de las HDL [241]. Estudios recientes han demostrado que el tratamiento de ratones carentes de rLDL (*Ldlr*^{-/-}), modelo que desarrolla aterosclerosis, con anti-miR-33 incrementa el TRC. De acuerdo con este resultado, dichos ratones mostraron una reducción en el tamaño y el contenido de lípidos de la placa de ateroma, así como un aumento en los marcadores de estabilidad de la placa y una disminución de la expresión de genes inflamatorios [314].

MiR-33 controla también la expresión de enzimas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos, como son *Cpt1a*, *Crot* y *Hadhb* [241, 315]. El aumento de expresión de miR-33 disminuye la expresión de estas enzimas, lo cual resulta en una reducción de la β -oxidación [241]. Así pues, en una situación de deficiencia de colesterol, miR-33 integra una respuesta celular que comprende no solo la disminución de la exportación de aquel lípido, sino también la reducción del consumo de ácidos grasos.

Por otra parte, se conoce que el miR-758, un miRNA ampliamente distribuido, pero muy abundante en cerebro, y cuya expresión es inhibida por el colesterol, reprime la expresión de ABCA1 y la salida del colesterol celular hacia apo A-I en los macrófagos tanto humanos como de ratón, así como en células de neuroglioma humano *in vitro* [184]. Además, estudios muy recientes también han identificado al miR-144, cuya expresión aumenta en macrófagos e hígados de ratón tratados con activadores de LXR, como represor de la expresión de *Abca1* [185].

6. Aterosclerosis. Papel del macrófago

En la aterosclerosis se produce una alteración de la homeostasis de colesterol caracterizada por la acumulación localizada de este lípido en la íntima arterial. En particular, se

acumulan macrófagos con un elevado contenido de colesterol como consecuencia del desequilibrio entre la captación, esterificación y exportación del mismo. La aterosclerosis y los procesos trombóticos asociados a la rotura de placas de ateroma vulnerables son la principal causa de eventos cardiovasculares que, a su vez, son la primera causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. La aterosclerosis se define como una enfermedad compleja que transcurre con inflamación crónica de la pared vascular debido a la interacción entre lipoproteínas modificadas, macrófagos, linfocitos T y células endoteliales y musculares lisas en la íntima arterial. Su etiología es multifactorial y los desencadenantes pueden ser tanto factores locales como sistémicos que inducen el deterioro de la función vascular [316]. Aunque la hipercolesterolemia, y fundamentalmente concentraciones altas de colesterol-LDL, es un factor de riesgo muy importante, los mecanismos inmunitarios también juegan un papel relevante en el inicio y progresión de la aterosclerosis [317]. La hipercolesterolemia está asociada a un incremento de la infiltración de LDL a través del endotelio en las regiones de la pared vascular con predisposición a la lesión aterosclerótica, cuya permeabilidad está incrementada. Esto lleva a la acumulación de las partículas de LDL en el espacio subendotelial, donde interactúan con proteoglicanos y proteínas que estimulan su modificación mediante agregación, glicosilación, proteólisis enzimática, oxidación, etc., incrementando así su retención en la íntima vascular y su aterogenicidad [316]. Como consecuencia, tiene lugar un reclutamiento de monocitos en la íntima arterial, donde estos proliferan y se diferencian a macrófagos [317]. En los últimos años ha crecido el interés en la heterogeneidad de estos macrófagos, en cuanto a si son macrófagos implicados en procesos proinflamatorios (M1) o si son reguladores y reparadores (M2), aunque no se ha llegado a un consenso al respecto [318].

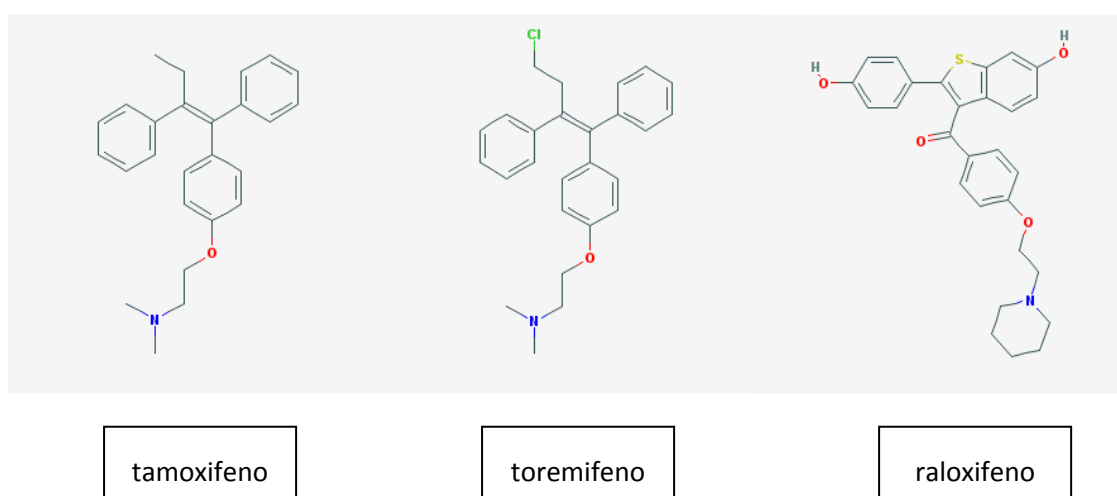
Los macrófagos captan activamente las partículas de LDL modificadas a través de los receptores *scavenger*, y acumulan el colesterol procedente de las mismas, en forma de ésteres, en gotas citoplasmáticas, previa acción de la acil-CoA-colesterol aciltransferasa 1 (ACAT-1). La célula adquiere así la apariencia de célula “espumosa”, lo que ya se aprecia en la lesión aterosclerótica temprana (estría grasa), pero es un hecho persistente en los diversos estadios del desarrollo de la placa. En respuesta a la carga de colesterol, los macrófagos activan mecanismos compensatorios para la salida de colesterol no esterificado hacia apo A-I y HDL, mediada por los transportadores ABCA1 y ABCG1 respectivamente (ver apartado 4.1). En este proceso puede estar implicada la acción previa de la colesterol esterasa neutra, que desesterifica los ésteres de colesterol para que el colesterol quede disponible para su exportación. De persistir la entrada de colesterol a la célula, los mecanismos de esterificación y excreción, así como la respuesta adaptativa de incremento de la síntesis de fosfolípidos, pueden verse excedidos, de manera que el colesterol libre alcance concentraciones citotóxicas que acaben desencadenando la muerte celular por necrosis o apoptosis [317, 319]. Además, los oxisteroles procedentes de las LDL-Ox tienen efectos citotóxicos [320]. Estos procesos explicarían la formación del núcleo necrótico rico en cristales de colesterol libre que se observa en las lesiones ateroscleróticas avanzadas [319].

Por otro lado, la carga de colesterol en macrófagos estimula la producción de mediadores inflamatorios, como citoquinas y especies reactivas de oxígeno, que reclutan otros tipos celulares, como los linfocitos T, provocando una respuesta inmune tanto humoral como innata que resulta en una inflamación local crónica [317]. Todo lo anterior nos indica que los procesos

que influyen en el balance de colesterol en el macrófago pueden exacerbar o reducir, según el proceso implicado, la formación de la lesión aterosclerótica. Además, la respuesta inmunitaria de los macrófagos juega un papel significativo en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. El conocimiento de los mecanismos que gobiernan estos procesos es, por tanto, de gran valor para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y terapia de la aterosclerosis.

7. Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) constituyen un grupo de compuestos con estructuras químicas variadas (Esquema 4), habitualmente sintéticos y no esteroídicos, que se unen con alta afinidad y especificidad a los receptores de estrógenos (ER) y poseen actividad agonista o antagonista de estrógenos según el tejido o tipo celular del que se trate [321, 322]. Algunos de los SERM actualmente disponibles son utilizados ampliamente en la clínica para la prevención y tratamiento del cáncer de mama y de la osteoporosis, el tratamiento de la disfunción ovulatoria y la contracepción [322]. En este apartado nos centraremos en los SERM sintéticos tamoxifeno, raloxifeno, y toremifeno (Esquema 4) y en el SERM endógeno 27-hidroxicolesterol.



Esquema 4. Estructura química de los SERM tamoxifeno, toremifeno y raloxifeno.

7.1. Tamoxifeno

El tamoxifeno (TAM), un agente derivado del trifeniletileno, fue originalmente desarrollado como un anticonceptivo postcoital. Curiosamente, se observó que inducía la ovulación, por lo que posteriormente se usó como tratamiento fertilizante [323]. El TAM se usa en la actualidad para el tratamiento del cáncer de mama de pacientes tanto premenopáusicas

como posmenopáusicas. Es administrado como citrato de TAM y sufre un intenso metabolismo en el tracto gastrointestinal y el hígado, particularmente por hidroxilación para dar el 4-hidroxitamoxifeno (TAM-OH) y el endoxifeno [324]. El TAM-OH tiene una alta afinidad por el ER α e inhibe el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama positivas para ER α y dependientes de estrógenos [323]. Debe mencionarse que el TAM también puede ejercer acciones antitumorales independientes de los ER, como es la inhibición de la PKC [325]. Así, puede inhibir las vías PKC/MEK/ERK y PKC/PI3K/Akt [326]. Por otra parte, en mujeres posmenopáusicas el TAM incrementa la densidad mineral ósea del esqueleto axial, efecto de carácter estrogénico, aunque en mujeres premenopáusicas pudiera causar una disminución de la misma [322, 323]. Entre los efectos secundarios del TAM cabe destacar el incremento del cáncer de endometrio, atribuible a su acción agonista de estrógenos en este tejido. Además, incrementa el riesgo de embolismo pulmonar, ictus y tromboembolismo venoso [323].

El TAM tiene un significativo impacto sobre el metabolismo lipídico. Así, tiene un efecto favorable sobre el perfil lipídico, ya que reduce las concentraciones plasmáticas de colesterol total y LDL, hecho en el que todos los autores coinciden, sin reducir las concentraciones de HDL [327] o, en ocasiones, aumentándolas ligeramente [328]. Estos datos unidos al hecho de que el TAM disminuyera la formación de lesiones lipídicas en la aorta de ratones [329, 330] y elevara las concentraciones circulantes y aórticas de TGF- β en ratones tratados con una dieta rica en grasas [329], alimentó la hipótesis de que el TAM pudiera ser protector frente a la aterosclerosis. Los primeros estudios en humanos indicaron que el TAM reducía el engrosamiento de la íntima y el riesgo de muerte por infarto de miocardio [330]. Sin embargo, estudios más recientes han cuestionado el efecto cardioprotector del TAM, ya que en los pacientes tratados no hubo un cambio significativo en los eventos relacionados con enfermedad coronaria (infarto de miocardio y angina) [322, 327].

El mecanismo preciso de la acción hipocolesterolemizante del TAM no se conoce, si bien se ha descrito que puede inhibir la biosíntesis de colesterol y, por otro lado, aumentar la captación de LDL. El TAM interfiere en la biosíntesis de colesterol inhibiendo la esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerasa [331], la esterol Δ^{24} -reductasa, la esterol Δ^{14} -reductasa y la esterol 14 α -desmetilasa [332]. Parte de sus efectos inhibitorios pueden estar mediados por su unión al complejo AEBS (*antiestrogen binding site*), formado por la esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerasa y la esterol Δ^7 -reductasa [333].

Estudios previos de nuestro laboratorio han descrito que el TAM incrementa la expresión y actividad del rLDL, lo que se asocia a la inhibición de la biosíntesis de colesterol y, de manera destacable, la interferencia en el mecanismo de retroregulación de la expresión del rLDL que ejerce el colesterol para controlar su homeostasis celular [334]. Así, el TAM inhibe el tráfico endosomal/lisosomal del colesterol captado por la célula con las LDL, el cual se acumula en estos orgánulos y no puede alcanzar el RE, compartimento donde el colesterol ejerce su acción reguladora inhibiendo la vía de los SREBP (apartado 5.1). Coherentemente con este resultado, el TAM también aumenta la expresión de la HMGCoAR, cuya transcripción también está regulada por SREBP. Por otro lado, el incremento en la actividad y expresión del rLDL por el TAM muestra una sinergia con el efecto ejercido por la lovastatina [334], inhibidor competitivo de la HMGCoAR, lo que indica que ambos fármacos estimulan la expresión del rLDL mediante distintos mecanismos: la lovastatina inhibe la biosíntesis de colesterol y el TAM le impide al mismo ejercer su efecto retroregulador. Estos resultados se obtuvieron con células MOLT-4, línea linfoblástica

que no expresa ER α [335]. Otros autores, transfectando los ER a células de hepatoma HepG2, han descrito que el TAM, así como el estradiol, estimula la transcripción del rLDL mediante la inducción de la unión de un complejo ER α /Sp1 a un elemento Sp1 presente en el promotor. Este efecto no se observó cuando se transfecó ER β [336].

Recientemente se ha reportado que el TAM y el TAM-OH aumentan la expresión de SR-BI en macrófagos de ratón hembra, pero no así en los de ratón macho. Dicho efecto, y de manera distinta al efecto del estradiol, no radica en un mecanismo transcripcional, sino que se ejerce mediante la estabilización de la proteína [337]. También se ha observado que el TAM inhibe la actividad de la ACAT, lo que previene la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos expuestos a LDL-Ac [338]. Por otro lado, el TAM puede alterar el metabolismo hepático de los ácidos grasos, de manera que un considerable porcentaje de mujeres tratadas desarrollan esteatosis. Ello puede radicar en un aumento de la disponibilidad de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos, sin un incremento de la lipogénesis [339, 340]. Por otro lado se han reportado casos, aunque pocos, de hipertrigliceridemia en mujeres por efecto del TAM [341].

Los diversos efectos secundarios indeseables del TAM han motivado la búsqueda de SERM alternativos, algunos de los cuales se están utilizando actualmente para el tratamiento del cáncer de mama y otras patologías.

7.2. *Toremifeno*

El toremifeno (TOR) es, al igual que el TAM, un derivado del trifeniletileno (tan solo difiere del TAM por la adición de un átomo de Cl a la posición 4; ver Esquema 4), y, como tal, el perfil farmacológico de ambos es muy parecido [342]. El TOR se utiliza para el tratamiento de cáncer de mama metastásico en mujeres posmenopáusicas con tumores positivos para ER o en las que se desconoce su estatus respecto a ER [322]. Estudios clínicos han demostrado que el TAM y el TOR tienen similares eficacias en cuanto a la velocidad de respuesta, tiempo de progresión y supervivencia, y muestran resistencia cruzada uno respecto al otro [322]. Además, sugieren que el TOR tiene similares efectos, aunque más atenuados, que el TAM en cuanto a incremento del riesgo de cáncer de endometrio, ictus y embolismo pulmonar [343]. Se ha documentado que el TOR reduce la incidencia del cáncer de próstata [344], aunque su perspectiva futura más halagüeña está en el tratamiento de la osteoporosis en pacientes con supresión androgénica, ya que, al igual que el TAM, aumenta la densidad mineral ósea [345, 346]. Por otra parte, se considera que el TOR tiene un efecto más favorable sobre el perfil lipídico que otros SERM, dado que, aparte de reducir la concentración de colesterol-LDL, puede aumentar la de colesterol-HDL [322]. Además, al igual que el TAM, el TOR interfiere en la síntesis de colesterol inhibiendo la esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerasa [331].

7.3. *Raloxifeno*

El raloxifeno (RAL), derivado del benzotiofeno (Esquema 4), se usó originalmente para el tratamiento de tumores resistentes al TAM, aunque mostró no ser eficaz en este sentido [323]. En ensayos clínicos el RAL ha causado una disminución de la incidencia de cáncer de mama, pero se distingue del TAM en que aquél actúa como antagonista de los ER en el útero, disminuyendo el riesgo de cáncer de endometrio [323, 347]. Al igual que el TAM, el RAL tiene efectos protectores en hueso, ya que aumenta la densidad mineral ósea, por lo que en la actualidad está

indicado para el tratamiento y prevención de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas [322, 323]. Estudios de seguridad han reportado que no incrementa el riesgo de ictus, cáncer de útero, hiperplasia de endometrio o cáncer de ovario [322].

El RAL comparte con el TAM y el TOR su capacidad para disminuir la concentración de las LDL [348, 349]. El RAL tampoco presenta efectos cardiovasculares beneficiosos ni adversos, según demuestran múltiples ensayos clínicos [322]. Por otra parte, el RAL también puede inhibir la actividad de la esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerasa [331] y la esterol Δ^{24} -reductasa [333] y, además, se ha descrito que también se une al complejo AEBS mencionado anteriormente [333].

Por último, mencionaremos que se han descrito acciones neuroprotectoras del RAL y el TAM en modelos experimentales de disfunción neuronal. Esto incluye modelos animales de lesiones traumáticas del sistema nervioso central y nervios periféricos, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo y desórdenes del comportamiento [350].

7.4. El 27-hidroxicolesterol, un SERM endógeno

El 27-hidroxicolesterol es un oxiesterol generado por la acción de la enzima CYP27A1, que es particularmente abundante en el hígado, donde contribuye a la síntesis de ácidos biliares. Además, CYP27A1 se expresa en el intestino, la vasculatura, el cerebro y los macrófagos, donde se sintetiza y exporta el 27-hidroxicolesterol como medio de eliminación de colesterol celular [38]. La mayor parte del 27-hidroxicolesterol circulante se transporta asociado a LDL y HDL, y la concentración de aquél en plasma se correlaciona con las concentraciones de colesterol y triglicéridos. La concentración circulante de 27-hidroxicolesterol se incrementa con la edad y se ha propuesto que provienen de tejidos extrahepáticos [37, 351, 352]. Comparada con la concentración plasmática de 27-hidroxicolesterol, su concentración en lesiones ateroscleróticas es órdenes de magnitud superior, acercándose a concentraciones milimolares en células espumosas y placas ateroscleróticas [37]. Las cantidades de 27-hidroxicolesterol circulantes son menores en mujeres que en hombres [353].

Hasta hace poco tiempo los únicos SERM reconocidos eran moléculas sintéticas. Sin embargo, se observó que el 27-hidroxicolesterol inhibía la activación de ER α y ER β por el estradiol, se unía directamente a ambos ER, modificaba la dinámica de reclutamiento de correuladores e inducía una conformación distinta en el ER α [353]. Además, se demostró que el efecto del 27-hidroxicolesterol sobre la transactivación del ER α y del ER β por la vía clásica de los elementos de respuesta a estrógenos (ver el siguiente apartado) podía variar de acuerdo con el tipo celular, pudiendo tener efecto agonista o antagonista de estrógenos [353]. El 27-hidroxicolesterol se comporta como un antagonista de los efectos cardiovasculares beneficiosos del estradiol, ya que inhibe los efectos de éste sobre la producción de óxido nítrico, lo que resulta en una disminución de la vasorrelajación y reendotelización arterial [354]. Respecto al cáncer de mama, el 27-hidroxicolesterol es agonista de los ER en tumores positivos para estos receptores, estimulando el crecimiento tumoral [355]. En hueso juega un papel antagonista, mostrando efectos adversos sobre la mineralización del hueso [356].

7.5. *Mecanismo de acción mediante los receptores de estrógenos*

Los estrógenos influyen en la expresión génica y el fenotipo celular. La vía de acción clásica, aunque no la única, consiste en la difusión en la célula y posterior unión del 17 β -estradiol a los receptores ER que se encuentran en el núcleo. Esto activa la dimerización de dichos receptores, la asociación con varios coactivadores y correpresores en mayor y menor medida, respectivamente, y subsiguiente unión a elementos de respuesta a estrógenos en el promotor de los genes diana. La estructura de los ER se ha dividido en seis regiones (A-F). La transcripción génica es activada a través de dos dominios distintos de transactivación de los ER, llamados AF-1, en la región NH₂-terminal A/B y cuya actividad es independiente del ligando, y AF-2, en la región E COOH-terminal y cuya actividad depende de la unión de la hormona [357, 358]. También contienen un dominio central C, de unión al DNA. Se ha establecido que los ER unidos a ligando pueden interactuar directamente con otros factores de transcripción y regular la expresión de las dianas de éstos, como sucede, por ejemplo, mediante la interacción con los factores de transcripción AP-1 (c-fos y c-jun) [342].

Se han identificado dos subtipos de ER, el α (ER α) y el β (ER β), que presentan gran homología en el dominio C pero difieren en que la actividad del dominio AF-1 de ER β es considerablemente menor que la de ER α [359]. Además, el ER β carece de una buena parte de la región F COOH-terminal del ER α [342]. La distribución tisular de ambos receptores es diferente, lo que implica diferentes papeles fisiológicos [342].

El efecto agonista o antagonista de estrógenos de los SERM radica en la inducción de conformaciones distintas en el ER cuando se le unen distintas moléculas, como el estradiol o los distintos SERM. Ello determina el tipo de interacción del ER con el DNA (directa, mediante el elemento de respuesta a estrógenos, o indirecta, mediante otro factor de transcripción) y la capacidad de reclutar distintos coactivadores y correpresores. El ER unido a TAM es capaz de dimerizarse y unirse al DNA, pero los efectos posteriores son diferentes que cuando se le une estradiol, dado que el TAM induce una conformación alterada, la cual resulta en un cambio en el balance de los coactivadores y correpresores que se unen al receptor. Así, el TAM unido al ER puede bloquear la transcripción génica a través del dominio AF-2 mientras que la transcripción génica dependiente de AF-1 todavía puede ocurrir [342]. Se ha comprobado que el tamoxifeno es un agonista de los genes regulados por AP-1 tanto con ER α como con ER β [360], mientras que los estrógenos unidos a ER β inhiben la transcripción de AP-1 [361]. Finalmente, las concentraciones de coactivadores y correpresores en un tipo celular específico pueden también determinar la respuesta del ER ante un ligando determinado. Por lo tanto, diferencias en la expresión relativa de ER α y ER β , diferencias en el balance entre coactivadores y correpresores e incluso la actividad de la vía de AP-1 pueden dar cuenta de las respuestas diferenciales agonista/antagonista de los distintos SERM en los diferentes tejidos [342].

El mecanismo de acción de los SERM contrasta con el de los represores selectivos de los receptores de estrógeno (SERD: *selective estrogen receptor down-regulators*), los cuales son antiestrógenos “puros”, sin actividad agonista sobre ER α o ER β . Es el caso del fulvestrant (ICI 182,780), que consta de una estructura esteroide con una larga cadena lateral alquilsulfinil en la posición 7 α . Este compuesto altera la conformación del ER de tal manera que no puede formar

dímeros, se acelera su degradación y se reduce su concentración intracelular. El ICI 182,780 tiene una afinidad por el ER aproximadamente 100 veces mayor que el TAM y tiene la capacidad de bloquear completamente las actividades de estrógenos y antiestrógenos [342].

Por otro lado, se han descrito ER (distintos de ER α y ER β), que son proteínas transmembrana como el ER1 acoplado a proteínas G (GPER, anteriormente llamado GPR30) y que participan en vías de señalización rápida en respuesta a estrógenos [362]. Estos receptores están implicados en procesos diversos en el sistema reproductivo, nervioso, endocrino, inmune y cardiovascular [301]. Los SERM pueden unirse a estos receptores pudiendo actuar como agonistas o antagonistas de los mismos [327]. Curiosamente, algunos miembros de los SERD pueden actuar como agonistas de estos receptores [301].

OBJETIVOS

1. Estudiar los efectos del tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno y de sus combinaciones con lovastatina sobre la expresión de genes implicados en la homeostasis de colesterol.
2. Estudiar el efecto de estos SERM sobre el tráfico intracelular del colesterol derivado de LDL nativas o acetiladas en distintos tipos celulares.
3. Evaluar el efecto del tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno sobre la exportación del colesterol hacia apo A-I y HDL en macrófagos humanos y de ratón.
4. Analizar la implicación de los receptores de estrógenos en los efectos del tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno *in vitro*.
5. Analizar el efecto de los SERM sobre el catabolismo de las HDL en el ratón y la capacidad de estas partículas como aceptoras del colesterol de los macrófagos.
6. Estudiar el efecto de los SERM sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos en un modelo de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

El tamoxifeno (citrato de tamoxifeno) se obtuvo de Tocris Bioscience, el raloxifeno (hidrocloruro de raloxifeno) fue primero cedido amablemente por Lilly (Indianapolis, IN, EE.UU.) y posteriormente adquirido de Tocris Bioscience, y el toremifeno (citrato de toremifeno) fue cedido amablemente por Orion Pharma (Espoo, Finlandia). La lovastatina se obtuvo de Merck Sharp & Dohme (MSD), el 17 β -estradiol y el PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) de Sigma y el ICI 182,789 y el T0901317 de Tocris Bioscience. Todos ellos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, MSD) a una concentración final en cultivo de 0,044 % en volumen. La metil- β -ciclodextrina se obtuvo de Trappsol® (CTD, Inc) y la 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina de Fluka. La apo A-I se adquirió de Calbiochem y el M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) en InmunoTools. El Lymphoprep™ se obtuvo de Nycomed Pharma AS. El DEPC (dietilpírocarbonato) se obtuvo de Sigma y se diluyó al 0,1 % (v/v) en agua milliQ para obtener agua DEPC libre de ribonucleasas. Los radioisótopos [2-¹⁴C]acetato de sodio (53,9 mCi/mmol), [1,2-³H(N)]colesterol (44,5 Ci/mmol) y oleato de [1,2-³H(N)]colesterol (30-60 Ci/mmol) se adquirieron de PerkinElmer. Los otros productos químicos utilizados fueron de calidad para análisis.

Los medios de cultivo RPMI 1640, DMEM (con 1 mg/ml de glucosa) y DMEM (con 1 mg/ml de glucosa) sin rojo fenol se obtuvieron de PAA Laboratorios GmbH. El medio RPMI 1640 sin rojo fenol y el suero bovino fetal (SBF) se obtuvieron de Gibco BRL. El SBF tratado con dextrano y carbón activado para quitar los estrógenos fue de HyClone y el suero de hombre AB+ de Sigma. Los antibióticos con los que se suplementaron los medios, penicilina, estreptomicina y gentamicina, así como los aminoácidos no esenciales se obtuvieron de Gibco BRL, la glutamina de Sero-Med y el piruvato sódico de Sigma. La tripsina para despegar las células adherentes se obtuvo de Sigma y el salino tamponado con fosfato (PBS) de Biomérieux.

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

2.1.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Las células MOLT-4 (linfoblastos humanos, ATCC Nº CRL-1582) y THP-1 (monocitos humanos, ATCC Nº TIB-202) se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con SBF al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina, 100 μ g/ml de gentamicina y glutamina 2 mM y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Para llevar a cabo los experimentos, los monocitos THP-1 se diferenciaron a macrófagos mediante la incubación con 50 ng/ml de PMA durante 48 h.

Las células HepG2 (hepatocarcinoma humano, ATCC Nº CRL-11997) se mantuvieron en medio DMEM suplementado con SBF al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina, 100 μ g/ml de gentamicina, piruvato sódico 1mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM y se incubaron como se ha especificado anteriormente.

2.1.2. Aislamiento de macrófagos primarios humanos y de ratón

Los monocitos primarios humanos se aislaron de sangre periférica de hombres sanos a partir de *buffy coats* amablemente cedidos por el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, basándonos en el método de Böyum [363] con pequeñas modificaciones [364, 365]. Para ello, diluimos el *buffy coat* en proporción 1:1 (v/v) con PBS, pH 7,4, suplementado con EDTA al 0,02 %. Depositamos esta mezcla sobre 1 volumen de lymphoprep y centrifugamos a 805 x g durante 40 minutos a 19 °C. Tomamos la nube de células mononucleadas y la lavamos con PBS sin EDTA centrifugando a 100 x g durante 15 minutos a 19 °C. Cuando quedaron muchos eritrocitos en el *pellet* de células, se añadió un tampón de lisis de eritrocitos compuesto por NH₄Cl al 0,83 %, KHCO₃ al 0,1 % y EDTA 0,1 mM, pH 7,5, durante 5 minutos. Posteriormente, repetimos el lavado otras tres veces. Las células mononucleadas se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con suero de hombre AB+ al 1 %, se sembraron en frascos de cultivo cuya superficie había sido pretratada con suero humano y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Las células no adherentes se retiraron lavando con PBS y las células adherentes se desprendieron incubando con PBS suplementado con suero humano al 10 % y EDTA al 0,02 % a 8 °C durante 40 minutos. Estas células se lavaron con PBS mediante centrifugación a 100 x g durante 15 minutos a 19 °C y dos veces más centrifugando a 453 x g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con suero de hombre AB+ al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de gentamicina, glutamina 2mM y 20 ng/ml de M-CSF y se sembraron a una densidad de 10⁶ células/ml en placas de 12 pocillos (1 ml/pocillo) para los ensayos de exportación de colesterol, o en formatos mayores para otros ensayos. Las células se cultivaron durante 7 días a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % para su diferenciación a macrófagos.

Los macrófagos peritoneales de ratón se obtuvieron de ratones C57/BL6 macho. Para ello, se inyectaron intraperitonealmente 1 ml de tioglicolato de Brewer (Gibco) al 3 % y estéril. Los ratones se sacrificaron a las 72 h por sobredosis de anestesia (inhalación de isofluorano). Los macrófagos se colectaron mediante tres lavados del peritoneo con 5 ml de PBS estéril cada uno. Las células obtenidas se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en medio DMEM suplementado con suero deficiente en lipoproteínas (LPDS) al 1 %, se sembraron y se incubaron, como se ha indicado anteriormente, durante 2 h. Las células no adherentes se retiraron lavando tres veces con PBS. A las células adherentes se les añadió medio DMEM suplementado con LPDS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de gentamicina, piruvato sódico 1mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM y se incubaron como se ha especificado anteriormente.

2.2. Aislamiento de lipoproteínas y suero deficiente en lipoproteínas

Las LDL (densidad 1,019-1,063 kg/l) se aislaron mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad en rotor vertical a partir de la fracción retenida por las columnas de LDL-aféresis practicadas a pacientes hipercolesterolémicos y las HDL (densidad 1,063-1,21 kg/l) se aislaron mediante ultracentrifugación secuencial [366] a partir de plasmas de donantes sanos. Parte de

las LDL se modificó mediante oxidación, para lo cual se llevaron a una concentración de 3 mg de proteína por ml en PBS y se oxidaron mediante incubación con CuCl_2 10 μM o 20 μM durante 20 h a temperatura ambiente para obtener LDL con diferentes grados de oxidación [367]. Otra parte de las LDL se acetiló mediante tratamiento con anhídrido acético [367, 368]. Estas modificaciones químicas se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando el kit Lipo (Beckman Coulter). Para los experimentos de exportación celular de colesterol, las LDL y LDL-Ac se marcaron con $[^3\text{H}]$ colesterol. Brevemente, añadimos el $[^3\text{H}]$ colesterol requerido en cada caso a un criotubo y dejamos que se evaporase el etanol en el que venía disuelto. A continuación, añadimos LDL o LDL-Ac (120 $\mu\text{g}/\mu\text{Ci}$ de colesterol-LDL) y lo dejamos en agitación toda la noche. La concentración de apo A-I en las HDL aisladas se determinó por turbidimetría en un autoanalizador Architect 16000 (Abbot).

El suero deficiente en lipoproteínas (LPDS, densidad < 1,21 kg/l) se obtuvo mediante ultracentrifugación de SBF a densidad 1,21 kg/l. Antes de su utilización, las LDL, HDL y el LPDS se dializaron exhaustivamente frente a NaCl 0,15 M, pH 7,4, y se esterilizaron con filtros de 0,22 μm .

2.3. *Elaboración de complejos de colesterol y metil- β -ciclodextrina*

Para formar los complejos de colesterol con metil- β -ciclodextrina utilizamos el método descrito por Klein et ál. [369], con pequeñas modificaciones [370]. Brevemente, mezclamos una solución de metil- β -ciclodextrina 38,5 mM en agua con una solución de colesterol 38,5 mM en etanol en una proporción 10:1. Para evitar la precipitación del colesterol, realizamos la mezcla en agitación y con calor (60 $^{\circ}\text{C}$), añadiendo 100-200 μl de la solución de colesterol a la disolución de metil- β -ciclodextrina a intervalos de varios minutos. A continuación, evaporamos los solventes en un Speed-Vacuum SPD121P (Thermo Electron Corporation) y redisolvimos los complejos en agua suficiente para alcanzar una concentración 3 mM de colesterol.

2.4. *Extracción de RNA y mRNA*

Tras los tratamientos correspondientes, las células se centrifugaron y se lisaron en 1 ml de TRI Reagent por cada $5\text{-}10 \times 10^6$ células y se congelaron a -80 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Después, se añadieron 200 μl de cloroformo (Sigma) por cada ml de TRI Reagent, se agitaron con vortex y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$, se tomó la fase acuosa superior y se mezcló con 500 μl de isopropanol (Sigma) por cada ml de TRI Reagent. Tras dejarlas reposar durante 10 minutos, las muestras se centrifugaron a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 1 ml de etanol al 75 % en agua DEPC y se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 x g. El etanol se desechó y las muestras se dejaron secar para luego resuspenderlas en agua DEPC a 65 $^{\circ}\text{C}$. La concentración de RNA se midió en un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific) y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en tampón TAE (trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM).

El mRNA se aisló a partir de 100 µg de RNA total mediante columnas de oligo (dT) celulosa del kit de purificación GenElute™ mRNA MiniPrep (Sigma) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA se precipitó con etanol-acetato sódico 3:0,1 y glucógeno durante 16-20 h a -20 °C. Tras la precipitación, el mRNA se centrifugó y se lavó con 1 ml de etanol al 75 %. A continuación, las muestras se centrifugaron para descartar el etanol, se dejaron secar y se diluyeron con agua DEPC a 65 °C. Finalmente, el mRNA se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en tampón TAE.

2.5. Microarrays

El microarray desarrollado por nuestro grupo en el Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal (Cholestchip™) consta de 319 sondas de cDNA que fueron seleccionadas a partir de la base de datos I.M.A.G.E. Consortium y se obtuvieron de Open Biosystems. Los cDNA de los clones se amplificaron por PCR convencional usando los cebadores universales M13(-21) sentido 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' y M13/pUC antisentido 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'. La calidad de los productos de PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en tampón TAE. Cada sonda amplificada se resuspendió en la solución de impresión Micro Spotting Solution (ArrayIt®) y se imprimió sobre cristales tratados con aminoxilano (CapitalBio OPAMinoSlide). Las sondas control o calibradores Lucidea Universal ScoreCard se obtuvieron de General Electric Healthcare Life Sciences. La impresión de los microarrays se llevó a cabo en un robot de impresión SpotArray 72 (PerkinElmer) con cuatro agujas de impresión Telechem Stealth SMP3. Antes de cada impresión se procedió al riguroso lavado de las agujas con la solución Micro Clearing Solution (ArrayIt) durante 10 minutos en un sonicador. Posteriormente, las agujas se enjuagaron durante 5 minutos con agua miliQ en el mismo sonicador.

El microarray se subdividió en 4 subarrays con 14 filas y 49 columnas de sondas cada uno. Cada calibrador se imprimió por triplicado según un gradiente de concentración al principio y al final de cada subarray. Cada sonda se imprimió por triplicado y se incluyó en dos subarrays distintos. Se imprimieron dos microarrays en cada cristal. El DNA se fijó al cristal mediante una irradiación de 300 mJ de luz ultravioleta (GS Gene Linker, BioRad) y la posterior incubación a 80 °C durante 2 h. Tras cada serie de impresiones se realizaron tinciones con SyberGold e hibridaciones con M13 marcado con Cy5 sentido y antisentido para analizar la calidad de la impresión.

2.5.1. Marcaje del mRNA e hibridación sobre el microarray

Para bloquear los micorarrays, se les añadió una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) al 1 % y precalentada a 50 °C, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, para desnaturalizar las sondas, los cristales se incubaron en agua hirviendo durante 5 minutos y se fijaron durante 2 minutos con etanol al 95 % a 4 °C. Finalmente el cristal se secó con una bomba de aire Microarray Air Jet (ArrayIt).

Un µg de mRNA se marcó con Cy3-dUTP (control) o Cy5-dUTP (problema) (General Electric Healthcare Life Sciences) en una reacción de retrotranscripción con 0,5 µg/µl de oligo (dT) (Promega), 0,5 µg/µl de cebadores aleatorios (Promega), ditiotreitól 10 mM, 0,75 µl de una

mezcla de dNTPs (dATP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10 mM y dUTP 2 mM; Applied Biosystems), 30 U RNAsin (Promega) y 14 U de la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) durante 2 h a 42 °C. Los controles Lucidea™ Spike Mix (Amersham-General Electric Healthcare Life Sciences) se añadieron a las muestras control y problema antes de la reacción de marcaje. Posteriormente, el mRNA se degradó con NaOH 0,08N (Merck) y EDTA 40 mM (Sigma) durante 30 minutos a 65 °C. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). La degradación se detuvo con Tris-HCl 0,17 M, pH 7,5. Finalmente, las muestras control y problema se combinaron y se purificaron utilizando las columnas CyScribe™ GFX™ (Amersham-General Electric Healthcare Life Sciences) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. A las muestras marcadas se les añadieron 0,4 µg/µl de poli (dA) (Sigma) y 0,08 µg/µl de Cot-1 DNA (Invitrogen) y se secaron en un equipo Speed-Vacuum. La muestra liofilizada se resuspendió en 20 µl de solución de hibridación (formamida al 25 %, SSC al 2,98 %, SDS al 0,20 % y solución Denhart 5X en H₂O) y se incubó a 55 °C durante 3 minutos.

Las muestras así marcadas se hibridaron sobre los microarrays ya bloqueados y utilizando cubreobjetos LifterSlip (Erie Scientific Company). La hibridación se llevó a cabo en un hibridador BioMixer II (CapitalBio) a 55 °C durante 16-20 h. Tras la hibridación, los microarrays se lavaron con las soluciones Wash Buffers A, B y C de ArrayIt durante 5 minutos con cada una de ellas y en agitación. Finalmente el cristal se secó con una bomba de aire Microarray Air Jet.

2.5.2. **Análisis de los microarrays**

Los microarrays se escanearon con el ScanArray Express (PerkinElmer) usando el programa ScanArray Express 3.0. Las intensidades de fluorescencia de los canales Cy3 y Cy5 de cada sonda se registraron y se corrigieron por sustracción del fondo. Los datos corregidos se normalizaron por el método LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*), basado en la intensidad de las sondas control Lucidea Universal ScoreCard, y con un programa desarrollado específicamente para el Cholestchip utilizando el lenguaje R. Los datos normalizados se procesaron para eliminar los controles, los datos con intensidad por debajo del límite de confianza de detección del escáner y las réplicas inconsistentes. Se calcularon los coeficientes Cy5/Cy3 para cada sonda y, finalmente, se calculó la media aritmética de las réplicas y se transformaron los valores a logaritmo en base 2 (valor M). Se consideraron cambios de expresión significativos aquellos que alcanzaron valores de Cy5/Cy3 mayores o iguales a 1,80 ($M \geq 0,85$) y menores o iguales a 0,55 ($M \leq -0,85$).

Los datos así obtenidos se sometieron a análisis de agrupamiento (*cluster* jerárquico y *k-means*), mediante distancias euclídeas, con el programa MultiExperiment Viewer (Mev v3.1, [371], <http://www.tm4.org>). Finalmente, representamos los cambios obtenidos sobre la ruta de síntesis de colesterol con el programa PathwayEditor (<https://pathwayexplorer.genome.tugraz.at/>).

2.6. Ensayos de exportación celular de colesterol

Para algunos de los ensayos de exportación de colesterol por los macrófagos THP-1, estos se marcaron con 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]colesterol, añadido disuelto en etanol, en medio RPMI 1640 con LPDS al 10 % durante 24 h. Transcurrido este tiempo, lavamos las células exhaustivamente con PBS para eliminar la radiactividad excedente del medio y se dejaron equilibrar durante 1 h. A continuación, añadimos TAM 5 o 10 μM o vehículo (DMSO, concentración final de 0,044 %) en medio RPMI 1640 suplementado con LPDS al 10 % y una hora después añadimos 120 $\mu\text{g/ml}$ de colesterol en forma de LDL-Ac. Tras 24 h desde la adición del TAM retiramos el medio, lavamos las células y las incubamos durante 4, 8 o 24 h en medio RPMI 1640 suplementado con BSA al 0,2 % solo (sin aceptor) o conteniendo HDL (50 $\mu\text{g/ml}$ de apo A-I) o apo A-I (50 $\mu\text{g/ml}$).

Para estudiar la exportación del colesterol incorporado a la vía endosomal, los macrófagos THP-1 se preincubaron en medio RPMI 1640 con LPDS al 10 % durante 24 h. Posteriormente, se añadieron los distintos SERM a concentración 10 μM o vehículo en combinación o no con T0901317 1 μM y pasada una hora se les añadieron 120 $\mu\text{g/ml}$ de colesterol en LDL-Ac marcadas con [^3H]colesterol como se describe en 2.2. Pasadas 24 h desde la adición de los SERM lavamos las células exhaustivamente, las dejamos reposar 1 h y las incubamos durante 4 u 8 h en medio RPMI 1640 con BSA al 0,2 % solo (sin aceptor) o en presencia de HDL (50 $\mu\text{g/ml}$ de apo A-I) o apo A-I (50 $\mu\text{g/ml}$).

Para analizar la exportación del colesterol incorporado a la vía endosomal por los macrófagos primarios humanos, estos se trataron y marcaron de la misma manera especificada para los macrófagos THP-1. A continuación, las células se lavaron exhaustivamente y se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con BSA al 0,2 % solo (sin aceptor), HDL (50 $\mu\text{g/ml}$ de apo A-I) o apo A-I (50 $\mu\text{g/ml}$). Con estas células, la exportación se cuantificó en presencia o ausencia de LDL-Ac y de los distintos SERM según se detalla en Resultados.

Para el estudio en macrófagos peritoneales de ratón, estos se aislaron y se mantuvieron en medio DMEM suplementado con LPDS al 10 % y 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]colesterol en etanol durante 24. Sin cambiar de medio, añadimos cada uno de los SERM 10 μM o vehículo y una hora después 120 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-Ac. Trascorridas 24 h desde la adición de los SERM las células se lavaron exhaustivamente y se incubaron durante 8 h en medio DMEM con un 0,2 % de BSA solo (sin aceptor) o en presencia de HDL (50 $\mu\text{g/ml}$ de apo A-I) o apo A-I (50 $\mu\text{g/ml}$).

Transcurrido el tiempo de exportación, en todos los casos recogimos el medio, lo centrifugamos a 10 000 x g durante 10 minutos y cuantificamos la radiactividad en el sobrenadante. Por otra parte, lisamos las células con NaOH 0,1 M y SDS al 0,1 % y contamos la radiactividad. Calculamos la exportación de colesterol como el porcentaje de la radiactividad total del pocillo que se encontraba en el medio de cultivo y, para conocer la exportación inducida por apo A-I y HDL, sustrajimos la correspondiente a la condición sin aceptor. Todas las condiciones de cada experimento se realizaron por duplicado.

2.7. Estudio del transporte reverso de colesterol desde los macrófagos en ratones

Los animales utilizados en el presente estudio fueron ratones macho C57/BL6 obtenidos de Jackson Laboratories (#000664). Estos ratones se alimentaron con dieta de mantenimiento (A04, Safe, Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) que contenía un 3 % de grasas y un 0,02 % de colesterol. Los animales se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada a 20 °C, con ciclos de 12 h de luz/oscuridad y acceso a comida y agua *ad libitum*.

Los ensayos de TRC se realizaron siguiendo los métodos descritos por Escolà-Gil et ál. [285, 372] y Carpe-Berdiel et ál. [233]. Brevemente, para los experimentos *in vivo* los ratones de 10 semanas de edad, fueron alimentados *ad libitum* con una dieta tipo *western*, conteniendo un 21 % de grasas y 0,2 % de colesterol (TD88137, Harlan), durante un total de 4 semanas. En los últimos 10 días de esta dieta se les administraron, por sonda intragástrica, 0,25 mg/día (≈ 10 mg/kg/día) de TAM o RAL en una suspensión de carboximetilcelulosa al 1 %, o vehículo. Por otra parte, un grupo de ratones alimentados con la misma dieta y durante el mismo tiempo recibieron una inyección intraperitoneal de tioglicolato al 3 %. A las 72 h aislamos sus macrófagos peritoneales como hemos descrito más arriba y los marcamos con 5 μ Ci/ml de [3 H]colesterol, previamente disuelto en etanol, en medio RPMI 1640 suplementado con LPDS al 10 % durante 24 h. Seguidamente, añadimos TAM o RAL 10 μ M o vehículo y 120 μ g/ml de colesterol en forma de LDL-Ac, siguiendo el mismo procedimiento que para los experimentos de exportación de colesterol por los macrófagos peritoneales de ratón (apartado 2.6). Después de 24 h desde estas adiciones, las células se lavaron con PBS y se dejaron equilibrar durante 4 h en medio RPMI 1640 que contenía albúmina al 0,2 %. Estos macrófagos se suspendieron finalmente en NaCl al 0,9 % estéril y 500 μ l de esta suspensión, conteniendo entre 1,4 y 2,0 $\times 10^6$ células y entre 1,0 y 1,2 $\times 10^6$ cpm, se inyectaron intraperitonealmente a cada animal. A las 48 h de la inyección de los macrófagos, los animales se sacrificaron mediante sobredosis de anestesia (inhalaación de isofluorano), se obtuvo sangre por punción cardíaca para separar el suero y se extrajeron el hígado y el intestino delgado para guardarlo inmediatamente a -80 °C. Además, se colectaron las heces correspondientes al total de las 48 h desde la inyección de los macrófagos.

2.7.1. Determinación de los lípidos plasmáticos, hepáticos y fecales

Para medir la concentración de colesterol-HDL, tomamos parte del suero y precipitamos las lipoproteínas que contienen apo B utilizando una solución de ácido fosfowolfrámico 0,44 mM/MgCl₂ 20 mM (Roche). Los lípidos hepáticos y fecales se extrajeron con alcohol isopropílico/hexano 2:3 (v/v), en rotación toda la noche. Posteriormente, desechamos los sólidos y mezclamos 10 ml de la fase líquida con 3 ml de Na₂SO₄ 0,47 M durante 5 minutos. A continuación, centrifugamos las muestras 10 minutos a 1258 x g. Tomamos la fracción superior que contiene el colesterol y los triglicéridos en hexano y, después de evaporar el solvente, emulsionamos los lípidos por sonicación en colato sódico al 0,5 % para su posterior cuantificación. En el caso de las heces, colectamos también la fase inferior, que contenía los ácidos biliares, para cuantificar la radiactividad asociada a estos.

El colesterol total y colesterol-HDL del suero y el colesterol total y el libre hepáticos, así como los triglicéridos en cada caso, se determinaron usando kits comerciales (Roche y Wako) con un autoanalizador BM/HITACHI 917 (Roche Diagnostics). La concentración de triglicéridos se corrigió por el glicerol libre presente en el suero (Sigma Diagnostics). En las HDL aisladas de los ratones (ver más abajo), se cuantificó el colesterol total y libre (así como los triglicéridos y los fosfolípidos mediante kits comerciales (Roche y Wako) mediante autoanalizador. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (Termo Scientific).

La cantidad de [^3H]trazador se determinó en un detector de centelleo líquido Tricarb 1500 (PerkinElmer). El [^3H]colesterol total en suero se midió directamente y el [^3H]colesterol-HDL, se midió después de precipitar las lipoproteínas que contienen apo B. Para medir el [^3H]colesterol en hígado y heces, después de llevar a cabo la extracción, se tomó la fracción lipídica, se evaporó el solvente y se midió la radiactividad. El radiotrazador presente en los ácidos biliares se midió en la fase acuosa de la extracción realizada en las heces. La determinación de la cantidad de radiactividad en el colesterol libre y esterificado en el hígado, se realizó separando estos por cromatografía en capa fina y midiendo la radiactividad presente en cada fracción. La cantidad de [^3H]trazador se expresó en todos los casos como fracción de la dosis inyectada.

2.7.2. Determinación del perfil de lipoproteínas por FPLC

El análisis de los perfiles plasmáticos de lipoproteínas mediante el método de filtración en gel FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) se realizó mezclando volúmenes iguales de suero de 4 ó 5 ratones por grupo. Se aplicaron 220 μl de cada una de estas mezclas en una columna de Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada con Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2 mM y NaN_3 al 0,02 %. La elución se realizó a un flujo de 0,3 ml/minuto y se colectaron fracciones de 0,4 ml. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos de cada fracción se midieron con los kits Cholesterol Reagent y Triglycerides Reagent, respectivamente, de Bradford Diagnostics (Kemia Científica). Asimismo, en las fracciones determinamos la cantidad de ^3H .

2.8. Análisis del catabolismo de las HDL en ratones

Este ensayo se realizó siguiendo el método descrito por Escolà-Gil et ál. [285]. Brevemente, los ratones recibieron la misma dieta y fármacos tal y como se ha descrito arriba. Parte de los ratones de cada grupo de tratamiento se sacrificaron para obtener los plasmas, utilizando como anticoagulante $\text{Na}_2\text{-EDTA}$. En estos se midió la concentración de colesterol y se aislaron las HDL por ultracentrifugación secuencial en un rango de densidad 1,063-1,210 kg/l . Tras dializar las HDL frente a NaCl 0,15 M, parte de ellas se marcó con oleato de [^3H]colesterol incubándolas en presencia de LPDS de ratones transgénicos para CETP (HDL y LPDS correspondientes a 1ml de suero) durante 16 h a 37 °C. A continuación, las HDL marcadas se aislaron mediante ultracentrifugación, se dializaron y se inyectaron, por la vena de la cola, a ratones del mismo grupo que los donantes de esas HDL. Las cantidades de oleato de [^3H]colesterol inyectadas por animal fueron: 741 000, 709 000 y 789 000 cpm en los ratones tratados con el vehículo, TAM y RAL, respectivamente. A continuación, se tomaron muestras de sangre de la cola a diferentes tiempos para medir la radiactividad en el suero. Estos datos se utilizaron para trazar una curva que linealizamos transformando las cpm logarítmicamente y con

la que calculamos la tasa catabólica fraccional como la inversa de la pendiente de la recta resultante. A tiempo final, se colectaron, además de sangre, el hígado y las heces de los ratones sacrificados y se midió la distribución del radiotrazador en estos compartimentos.

2.9. Determinación de la capacidad de las HDL y el plasma de ratones para aceptar colesterol de los macrófagos

Para evaluar la capacidad de las HDL y el plasma de los ratones tratados con TAM, RAL o vehículo para captar el colesterol exportado por macrófagos, estos se aislaron del peritoneo de ratones no tratados tal y como se ha referido más arriba y se marcaron con [^3H]colesterol en etanol de igual manera a la descrita anteriormente. La exportación de colesterol se dejó transcurrir durante 8 h en medio DMEM con BSA al 0,2 % solo o con las distintas HDL (40 μg de proteína). Para evaluar la capacidad de los plasmas, la exportación se ensayó en medio DMEM solo o con cada uno de los plasmas al 1 % durante 8h. A continuación, los medios y las células se procesaron como se ha indicado anteriormente para calcular la exportación de [^3H]colesterol en porcentaje del total.

2.10. Reacción de retrotranscripción y PCR en tiempo real

La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 500 ng de mRNA con el kit PrimeScriptTM RT Reagent (Takara) en un volumen final de 10 μl que contenía 25 pmol de oligo (dT), 50 pmol de cebadores aleatorios de seis nucleótidos (*Random Hexamers*) y 0,5 μl de la mezcla de transcriptasa reversa PrimeScript. La reacción se desarrolló mediante una incubación de 15 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ y una inactivación de 5 segundos a 85 $^{\circ}\text{C}$.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo con el kit LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) en un termociclador LightCycler[®] 480 II, y los resultados se analizaron con la plataforma informática del termociclador (LightCycler[®] 480 software, versión 1.5). Para la reacción, la DNA polimerasa se activó a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos con cambios de 4,4 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$. Seguidamente, se realizaron 45 ciclos de amplificación cuyas condiciones fueron: 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos, 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos y 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos. Luego, para obtener la curva de disociación del producto de amplificación se llevó la muestra de 65 $^{\circ}\text{C}$ a 97 $^{\circ}\text{C}$ con cambios de 0,11 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$. Los resultados se cuantificaron según el método del ΔCP descrito por Pfaffl [373], obteniéndose la expresión relativa de cada gen calculando el incremento de CP (ΔCP), que se corrigió por la eficiencia del ensayo para cada pareja de cebadores y se normalizó por el control invariable (*housekeeping*) RPLP0 (gen de la proteína ribosomal grande P0) para muestras humanas y Cypb (Ppib, peptidilpropil isomerasa B) para muestras de ratón. Los cebadores utilizados en cada caso aparecen en las **Tablas 1 y 2**.

<i>Homo sapiens</i>			
Gen	NCBI Reference Sequence	Nombre cebador	Secuencia
ABCA1	NM_005502	ABCA1 Fw ABCA1 Rev	5'-GCACTGAGGAAGATGCTGAAA-3' 5'-AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTC-3'
ABCG1	NM_004915	ABCG1 Fw 1.1 ABCG1 Rev 1.1	5'-TTCTGACATTTCCCCTGGAG-3' 5'-CAGTAGGCCACTGGGAACAT-3'
APOE	NM_000041	APOE Fw (09/05) APOE Rev (09/05)	GGTCGCTTTTGGGATTACCT CTCAGTTCCTGGGTGACCTG
BCL2	NM_000633	BCL2 Fw 1.1 BCL2 Rev 1.1	5'-GGTCATGTGTGTGGAGAGC-3' 5'-GATCCAGGTGTGCAGGTG-3'
CD36	NM_000072	hCD36-Fw hCD36-Rw	5'-CTGTGACCGGAACTGTGGGCT-3' 5'-GAAGATGGCACCATTTGGGCTG-3'
DHCR24	NM_014762	DHCR24 Fw 1.1 DHCR24 Rev 1.1	5'-GCCGCTCTCGCTTATCTTCG-3' 5'-GTCTTGCTACCCTGCTCCTT-3'
ERG25	NM_001017369 NM_006745	erg25 Fw 1.0 erg25 Rev 1.0	5'-GGCAAGATGCTTTGTTGTG-3' 5'-TCTCCAGAAGCAATGTTAGC-3'
ESR1	NM_000125	ESR1 Fw 1.1 ESR1 Rev 1.1	5'-CCACCAACCAGTGACCACTT-3' 5'-GGTCTTTTCGTATCCCACCTTTC-3'
ESR2	NM_001040275	ESR2 Fw 1.1 ESR2 Rev 1.1	5'-AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG-3' GACAGCGCAGAAGTGAGCATC-3'
FABP1	NM_001443	FABP1 Fw 1.1 FABP1 Rev 1.1	5'-ATGAGTTTCTCCGGCAAGTACC-3' 5'-GATTTCCGACACCCCTTGA-3'
FDFT1	NM_004462	FDFT Fw 1.2 FDFT Rev 1.2	5'-ATGGAGTTCGTGAAATGCCTT-3' 5'-TGCGACTGGTCTGATTGAGATA-3'
FOXA1	NM_004496	FOXA1 Fw 1.2 FOXA1 Rev 1.2	5'-CTGCACCTGAAAGGGGACC-3' 5'-GCCTTGAAGTCCAGCTTATGC-3'
HMGCR	NM_000859	HMGCR Fw 1.1 HMGCR Rev 1.1	5'-GGACCCCTTTGCTTAGATGAAA-3' 5'-CCACCAAGACCTATTGCTCTG-3'
INSIG1	NM_005542 NM_198337	INSIG1 Fw 1.1 INSIG1 Rev 1.1	5'-CCTGGCATCATCGCCTGTT-3' 5'-AGAGTGACATTCTCTGGATCTG-3'
LDLR	NM_000527 NM_001195800 NM_001195803	LDL receptor Fw LDL receptor Rev	5'-GCGAAGATGCGAAGATATCGATG-3' 5'-CCGTTGGTGAAGAAGAGGTAG-3'
MVD	NM_002461	MVD Fw 1.1 MVD Rev 1.1	5'-GAAGCGGAGGAACCTAACGG-3' 5'-GTGTAGGCTAGGCAGGCATA-3'
NPC1	NM_000271	hNPC1-Fw hNPC1-Rw	5'-CTTAGTGCAGGAACCTGTCCAGG-3' 5'-TCCACATCCCGGCAGGCATTGTAC-3'
NPC2	NM_006432	hNPC2-Fw hNPC2-Rw	5'-GGTTTGTCTTGTGACCGC-3' 5'-AGGAATGTAGCTGCCAGG-3'
RPLP0	NM_001002 NM_053275	RPLP0 Fw RPLP0 Rev	5'-CCTCATATCCGGGGGAATGTG-3' 5'-GCAGCAGCTGGCACCTTATTG-3'
SCARB1	NM_001082959 NM_005505	SCARB1 Fw 1.1 SCARB1 Rev 1.1	5'-GGCTGAGCAAGGTTGACTTC-3' 5'-AGAACTCCAGCGAGGACTCA-3'
SCD	NM_005063	SCD Fw 1.1 SCD Rev 1.1	5'-TCTAGCTCCTATACCACCACCA-3' 5'-TGTCGTCTTCCAAGTAGAGGG-3'
SRBF1	NM_001005291 NM_004176	SREBF1 Fw 1.1 SREBF1 Rev 1.1	5'-GCAAGGCCATCGACTACATTC-3' 5'-GACAGCAGTGCGCAGACTTA-3'
SRBF1C	NM_001005291	SREBP1a Fw 1.1 SREBP1a Rev 1.1	5'-ACCGACATCGAAGGTGAAGT-3' 5'-AGCATGTCTTCGAAAGTGCA-3'
SREBF2	NM_004599	SREBF2 Fw 1.1 SREBF2 Rev 1.1	5'-CTCACCTTCCTGTGCCTCTC-3' 5'-AGGCATCATCCAGTCAAACC-3'
TFF1	NM_003225	TFF1 Fw 1.1 TFF1 Rev 1.1	5'-CATCGACGTCCTCCAGAAGAG-3' 5'-CTCTGGGACTAATCACCGTGCTG-3'

Tabla 1. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real para genes humanos.

<i>Mus musculus</i>			
Gen	NCBI Reference Sequence	Nombre cebador	Secuencia
Abca1	NM_013454	Abca1 Fw 1.1 Abca1 Rev 1.1	5'-GTTACGGCAGATCAAGCATCC-3' 5'-TGGAAGGGACAAATTGTGCTG-3'
Abcg1	NM_009593	Abcg1 Fw 1.1 Abcg1 Rev 1.1	5'-GGGGAAGGTCTCCAATCTC-3' 5'-TGTCTGATCCCCGTACTCC-3'
Abcg5	NM_031884	Abcg5 Fw 1.1 Abcg5 Rev 1.1	5'-CGCGAGACGTTGCGATACA-3' 5'-CTGCCAATCATTTGGTCCGC-3'
Abcg8	NM_026180	Abcg8 Fw 1.1 Abcg8 Rev 1.1	5'-CTGTGGAATGGGACTGTACTTC-3' 5'-GTTGGAATGACCACTGTAGGT-3'
Cyp7a1	NM_007824	mCyp7a1 Fw 2.1 mCyp7a1 Rev 2.1	5'-CTGTCATACCACAAAGTCTTATGTCA-3' 5'-ATGCTTCTGTGTCCAAATGCC-3'
Cypb	NM_011149	mCypb Fw 1.1 mCypb Rev 1.1	5'-TGGAGAGCACCAAGACAGACA-3' 5'-TGCCGGAGTCGACAATGAT-3'
Ldlr	NM_010700 NM_001252658 NM_001252659	Ldlr Fw 1.1 Ldlr Rev 1.1	5'-TCAGACGAACAAGGCTGTCC-3' 5'-CCATCTAGGCAATCTCGGTCTC-3'
Npc1l1	NM_207242	mNpc1l1 Fw 2.1 mNpc1l1 Rev 2.1	5'-TGGACTGGAAGGACCATTTC-3' 5'-GACAGGTGCCCCGTAGTCA-3'
Scarb1	NM_016741 NM_001205082 NM_001205083	SCARB1 Fw 1.1 SCARB1 Rev 1.1	5'-TGTACTGCCTAACATCTTGGTCC-3' 5'-ACTGTGCGGTTTCATAAAAGCA-3'

Tabla 2. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real para genes de ratón.

2.11. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (western blot)

Las células se lavaron en PBS, se centrifugaron y el *pellet* se congeló en N₂ líquido. Posteriormente, se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8, KCl 120 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, Triton X-100 al 0,1 %, Nonidet P40 al 0,5 %, benzamidina 1 mM, 10 µg/ml antipaína, 1 µg/ml leupeptina, 40 µg/ml aprotinina, NaF 100 mM, molibdato sódico 20 mM, β-glicerofosfato 20 mM, ortovanadato sódico 2 mM y PMSF 1 mM) durante 20 minutos en agitación y seguidamente se sonicaron a 4 °C. Para la detección de SREBP-2, se añadió 1 µg/ml del inhibidor de la caspasa-3 Ac-DMQD-CHO (Alexis) al tampón de lisis, y cada muestra se pasó 10 veces a través de una aguja de 25 G. La valoración de la concentración de proteínas se realizó por el método del ácido bicinónico (BCA Protein Assay Kit, Pierce).

La electroforesis se realizó cargando 50 µg de proteína en el caso de líneas celulares y 100 µg en el caso de tejidos, en condiciones reductoras y desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE) y siguiendo el método de Laemmli [374]. Luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia líquida. La membrana se bloqueó con caseína al 0,1 % en salino tamponado con Tris (TBS), pH 7,4. Posteriormente, se procedió a la inmunodetección con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 3**), seguidos de anticuerpos secundarios marcados con IRDye® 800 CW o IRDye® 680 LT (LI-COR® Biosciences), diluidos todos ellos en caseína al 0,1 % en TBS-Tween 20. Acto seguido, se detectó la fluorescencia y se cuantificó la densidad óptica de las bandas con el escaner Odyssey 9120 (LI-COR Biosciences).

Proteína	Origen	Anticuerpos	
		Referencia	Casa Comercial
ABCA1	monoclonal de ratón	ab18180-100	Abcam
ABCG1	policlonal de conejo	ab36969	Abcam
ABCG5	policlonal de conejo	amablemente cedido por el Dr. Albert Groen (Department of Vascular Medicine, Academic Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands)	
ABCG8	monoclonal de ratón	NBP1-71706	Novus
CD36	policlonal de conejo	NB400-144	Novus
LDLr	policlonal de pollo	AB3461	Millipore
NPC1	policlonal de conejo	NB400-148	Novus
SREBP-2	policlonal de conejo	ab30682	Abcam
SR-BI	policlonal de conejo	NB400-101	Novus
Actina	policlonal de cabra	sc1616	Santa Cruz
Calnexina	policlonal de conejo	ab10286	Abcam
GAPDH	policlonal de conejo	sc-25778	Santa Cruz

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los ensayos de *western blot*.

2.11.1. Aislamiento de membranas celulares para *western blot*

Para la detección de ABCG5 y ABCG8 en hígados de ratón por *western blot* fue necesario, debido a su baja expresión, aislar y concentrar las membranas celulares. Para ello, resuspendimos el tejido en 1 ml de tampón HEPES 10 mM, pH 7,6, y lo homogenizamos durante 15 segundos con un politrón a velocidad moderada. Centrifugamos esta mezcla a 600 x g durante 10 minutos a 4 °C y recogimos el sobrenadante. Este lo centrifugamos a 48 000 x g durante 30 minutos a 4 °C en una ultracentrífuga TL-100 con el rotor TLA 100.2 (Beckman). Descartamos el sobrenadante (fracción citoplasmática) y redisolvimos el precipitado (fracción de membranas) en tampón Tris 50 mM, pH 7,5, suplementado con inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific). En la disolución valoramos la concentración de proteínas como se describe arriba.

2.12. Determinación del contenido celular y la biosíntesis de colesterol

Para la determinación del contenido de colesterol las células se lisaron con el mismo tampón descrito en el apartado de *western blot* pero sin detergentes y se extrajeron los lípidos siguiendo el método de Folch [375] con pequeñas modificaciones [376]. Brevemente, mezclamos 200 µl del lisado celular con 300 µl de NaCl al 0,88 % y 2 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) que contenía 25 µg/ml de alcohol batílico como estándar interno, y agitamos la mezcla durante 2 h. Seguidamente, la centrifugamos a 805 x g durante 5 minutos a 4 °C, tomamos la fase inferior y la lavamos con 1 ml de metanol/agua 1:1 (v/v). Posteriormente, agitamos con vortex, centrifugamos, colectamos la fase inferior y evaporamos el solvente bajo corriente de nitrógeno. El extracto de lípidos lo disolvimos en 100 µl de cloroformo. Las muestras (20 µl) se analizaron con un equipo HPLC (*High performance liquid chromatography*) y detector ELSD (*evaporative light scattering detector*). La columna empleada fue una Kinetex-HILIC (2,6 µm, 100 x 46 mm, Phenomenex) con una precolumna (HILIC, 4,6 mm, Phenomenex). Como eluyente se usó un gradiente cuaternario de mezcla de solventes como se describió en [376]. El solvente A fue isooctano/tetrahidrofurano 99:1 (v/v), el B fue acetona/diclorometano 4:1 (v/v), el C

isopropanol/cloroformo 4:1 (v/v) y el D isopropanol/agua 1:1 (v/v) con ácido acético 10 mM, etanolamina 5 mM y tretilamina 5 mM, todo ello ajustado a pH 5. El flujo de elución fue de 1,5 ml/minuto y la temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C.

Para estudiar la síntesis de colesterol, las células se expusieron a los distintos tratamientos y pasadas 2 h se añadió un pulso de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ acetato y se prolongó la incubación durante 8 h más. Una vez finalizada esta, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con 500 μl de KOH al 10 %. Estas muestras se trataron seguidamente con cloroformo/metanol 2:1 (v/v) para extraer la fracción lipídica (método de Folch), de la que posteriormente se separaron los lípidos no saponificables con hexano, previa saponificación con KOH 1 M en etanol al 95 % a 90 °C durante 1 h. Los lípidos no saponificables en hexano se analizaron mediante HPLC. El porcentaje de recuperación fue calculado mediante un estándar interno de ergosterol. La cromatografía se realizó utilizando una columna de fase reversa Luna-Pack 5 μm C18 (250 x 4,60 mm, Phenomenex). Los lípidos se eluyeron con acetonitrilo/agua 95:5 (v/v) durante los primeros 37 minutos y a continuación con metanol absoluto a un flujo de 1,2 ml/minuto. En el eluido se monitorizó simultáneamente la absorción a 206 nm (detector de onda variable Beckman 168) y la radiactividad (LB-506 C-1, Berthold). Los esteroides eluidos se identificaron comparando sus tiempos de retención con la de estándares puros y mediante su espectro de absorción de luz UV.

2.13. Microscopía

En el caso de células adherentes, se sembraron 5×10^4 - 10^5 células/ cm^2 sobre un cubreobjetos con sustrato de poli-D-lisina y se incubaron a 37 °C durante el tiempo de los tratamientos correspondientes. En el caso de células no adherentes, estas se mantuvieron en suspensión durante los tratamientos; 2 h antes de terminarlos se sembraron 7×10^4 células/ cm^2 sobre los cubreobjetos con sustrato de poli-D-lisina y se continuó la incubación a 37° C para permitir su adhesión. En los ensayos en los que se tiñeron los lípidos neutros, las células se incubaron en presencia de Bodipy® (Molecular Probes) 10 μM durante los 30 minutos antes de terminar los tratamientos. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 5 minutos, tras lo cual se lavaron otras tres veces y se mantuvieron en PBS a 4 °C.

Para teñir el colesterol libre, las células se incubaron con 35 $\mu\text{g/ml}$ de filipina en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Seguidamente, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se montaron sobre los portaobjetos con medio de montaje ProLong® Gold antifade reagent. Luego, las células MOLT-4, HepG2 y THP-1 se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y los macrófagos primarios humanos y de ratón en un microscopio Nikon Eclipse Ti-E acoplado a un módulo confocal NiKon C-1.

2.14. Análisis estadísticos

El efecto de los SERM fue analizado con el test ANOVA de una vía para medidas repetidas. Para evaluar el efecto de varias dosis de SERM o la interacción de los SERM con otros fármacos se utilizó el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas. Los efectos de los SERM sobre los diferentes grupos de ratones se analizaron con el test ANOVA de una vía. Para las comparaciones múltiples post-hoc se utilizó el test de Student-Newman-Keuls. Los análisis fueron realizados con el programa SigmaStat 2.0.

RESULTADOS

1. Efecto de los SERM sobre la expresión génica en líneas celulares

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el TAM interfiere en el tráfico intracelular de colesterol en las líneas celulares humanas MOLT-4 y HepG2, lo que resulta en la estimulación de la expresión y actividad de rLDL, efecto que, además, es sinérgico con el de la lovastatina (LOV) [334]. Este efecto del TAM podría explicar, al menos en parte, su acción hipocolesterolemizante. Otros SERM, como el RAL y el TOR, comparten con el TAM su capacidad para disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol-LDL [322, 327, 328, 348, 349]. Dada la amplia utilización clínica que tienen estos fármacos decidimos estudiar más profundamente sus efectos sobre la homeostasis lipídica celular, haciendo hincapié en la homeostasis del colesterol. Nuestro primer paso en este sentido fue el análisis de los efectos de dichos fármacos sobre la expresión génica en las líneas celulares MOLT-4 y HepG2.

1.1. Análisis de los efectos de los SERM sobre la expresión génica en células MOLT-4 mediante microarrays

Comenzamos nuestro estudio analizando los cambios de expresión génica mediante un microarray dirigido al estudio de genes del metabolismo lipídico y el ciclo celular. Este microarray, llamado Cholestchip®, ha sido desarrollado en nuestro laboratorio y contiene 317 sondas. Para el ensayo los linfoblastos MOLT-4 se trataron con cada uno de los SERM en combinación o no con LOV y en presencia de LDL durante 15 h en dos experimentos independientes. Luego extrajimos el mRNA y analizamos los cambios de expresión con el Cholestchip®. Los datos de los dos experimentos se analizaron conjuntamente como se explica en Materiales y Métodos.

De los 317 genes presentes en el microarray, 119 se expresaron en todas las condiciones (37,5 %). De ellos 56 (47,1 %) cambiaron significativamente en al menos una condición con el criterio $M \geq 0,85$ o $M \leq -0,85$, en el que $M = \log_2$ (fluorescencia muestra tratada /fluorescencia muestra control) (Fig. 1). Mediante análisis de agrupamiento o de cluster, utilizando el método de *k-means*, con distancias euclídeas, encontramos cuatro conjuntos de genes con una respuesta similar entre sí. El primero de los cluster estaba constituido por genes que aumentaron mucho su expresión por efecto de los SERM, aumento que se potenciaba en las combinaciones con LOV. En un segundo cluster el comportamiento era similar al anterior, pero con cambios de expresión menos intensos. Los datos de estos dos clusters están representados en la Tabla 4. Un tercer cluster estaba constituido por genes que se reprimían (Tabla 5). Por último, el cuarto cluster contenía genes cuya expresión no variaba o bien tenía un comportamiento errático. Hay que destacar que no encontramos ningún grupo de genes que tuvieran un comportamiento diferencial entre los distintos SERM.

RESULTADOS

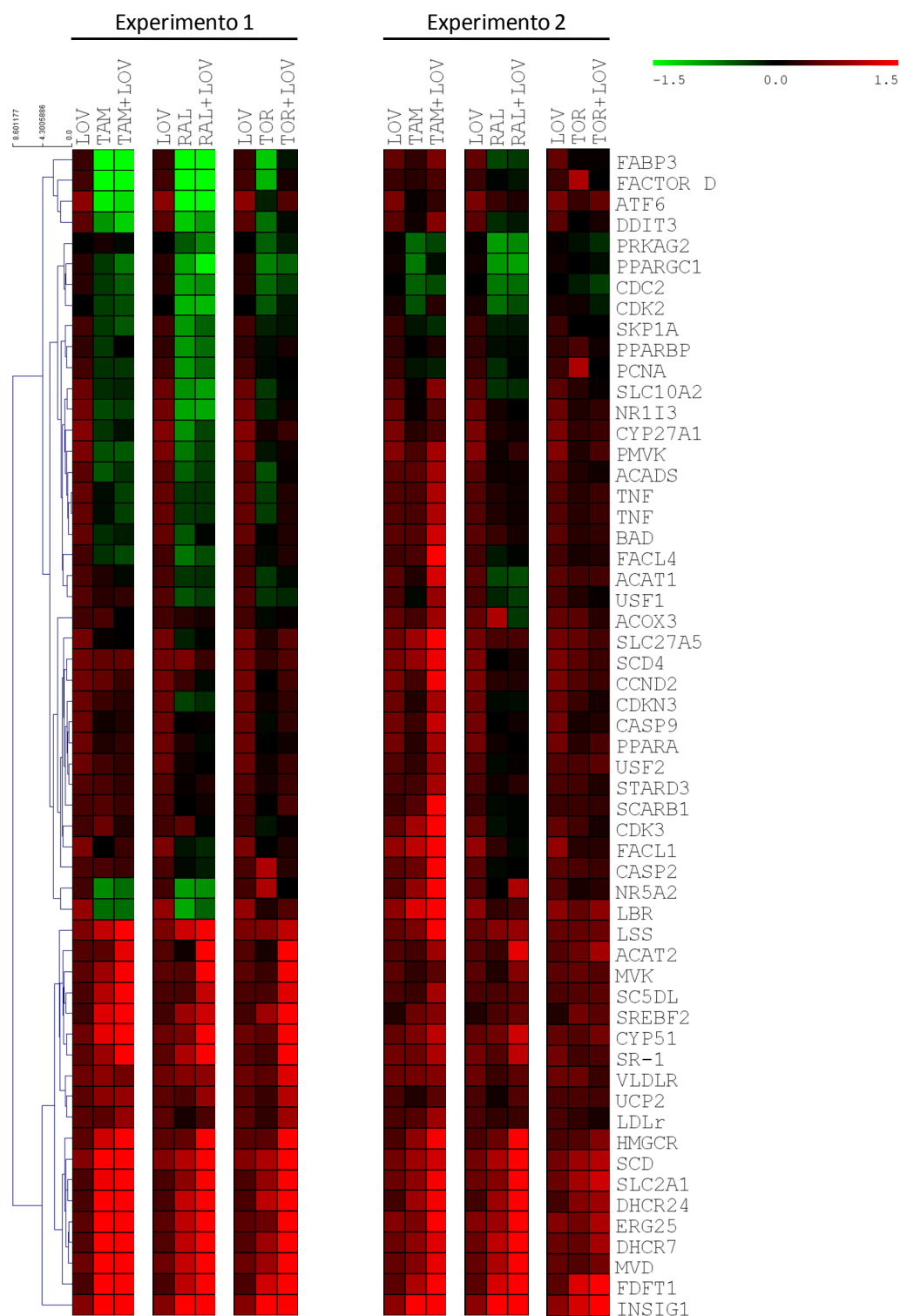


Figura 1. Análisis de los patrones de expresión mediante cluster de árbol jerárquico con distancias euclídeas en células MOLT-4 tratadas con cada uno de los SERM, LOV o sus combinaciones. Se representa, en escala de colores, el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de dos experimentos independientes. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura.

genes sobreexpresados								
acrónimo	LOV	TAM	TAM+LOV	RAL	RAL+LOV	TOR	TOR+LOV	nombre
LSS	1,68 1,51	2,27 1,68	3,32 3,46	2,33 1,69	2,68 1,84	1,69 1,49	2,19 1,55	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)
ACAT2	1,43 1,43	1,45 1,33	2,53 1,92	1,10 1,29	2,87 2,53	1,13 1,57	3,94 1,99	acetyl-coenzyme a acetyltransferase 2 (acetoacetyl coenzyme a thiolase)
MVK	1,45 1,47	1,88 1,25	2,68 1,48	1,40 1,16	3,51 1,73	1,27 1,52	2,68 1,40	mevalonate kinase (mevalonic aciduria)
SC5DL	1,37 1,36	2,08 1,30	3,46 1,99	1,36 1,35	2,22 1,44	1,37 1,41	2,43 1,46	Lanosterol 5-desaturase
SREBF2	1,33 1,16	2,46 1,57	3,53 1,73	1,92 1,35	2,33 1,53	1,92 1,60	3,07 1,47	sterol regulatory element binding transcription factor 2
CYP51	1,54 1,51	2,57 1,68	4,17 2,16	1,66 1,60	3,14 2,30	1,48 1,43	3,58 1,64	Lanosterol 14-alpha demethylase
SR-1	1,46 1,62	1,92 1,57	2,81 2,03	2,00 1,41	2,95 2,19	1,33 1,32	3,63 1,36	C14 sterol reductase
VLDLR	1,57 1,55	1,80 1,62	1,59 1,72	1,74 1,29	1,78 1,48	1,45 1,58	2,50 1,28	very low density lipoprotein receptor
UCP2	1,46 1,37	1,78 1,17	1,85 1,45	1,37 1,09	1,83 1,39	1,29 1,39	2,11 1,32	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
LDLR	1,44 1,38	1,47 1,41	1,85 1,89	1,11 1,23	1,38 1,29	1,22 1,23	1,88 1,12	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)
HMGCR	1,44 1,39	2,33 1,77	4,44 2,73	1,52 1,55	4,38 3,05	1,47 1,42	5,28 1,72	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase
SCD	1,72 1,61	2,81 1,88	4,29 2,31	2,07 2,04	4,35 3,03	2,04 1,87	5,10 2,08	stearoyl-coa desaturase (delta-9-desaturase)
SLC2A1	1,35 1,56	2,66 1,77	5,46 2,71	1,80 1,73	4,20 3,12	1,83 1,97	5,94 2,30	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
DHCR24	1,38 1,31	2,83 1,88	5,35 2,68	2,20 1,88	4,50 3,14	2,17 1,71	6,19 1,91	24-dehydrocholesterol reductase
ERG25	1,46 1,69	2,79 1,68	5,10 2,77	2,14 1,87	5,98 3,39	1,58 1,59	6,73 2,03	ERG25 (sterol C4 demethylase)
DHCR7	1,43 1,54	2,99 1,80	5,98 2,48	2,14 2,16	5,50 3,51	1,88 1,53	6,15 1,96	7-dehydrocholesterol reductase
MVD	1,56 1,52	2,85 1,74	5,24 2,57	2,22 2,01	6,96 3,51	1,91 1,40	5,74 1,59	mevalonate (diphospho) decarboxylase
FDFT1	1,38 1,48	2,91 2,04	5,31 3,05	2,13 2,36	4,44 3,53	2,28 2,43	5,70 3,41	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
INSIG1	1,71 1,78	5,58 2,87	12,64 4,23	3,97 3,58	10,70 5,28	4,35 2,41	12,38 3,46	insulin induced gene 1

Tabla 4. Genes cuya expresión aumentó por efecto de los SERM y la LOV en células MOLT-4 (*clusters* 1 y 2). Se representa la relación de fluorescencia de la muestra tratada respecto a la de la muestra control de dos experimentos independientes. Aparecen en gris los nombres de los genes diana de los SREBP.

genes reprimidos								
acrónimo	LOV	TAM	TAM+LOV	RAL	RAL+LOV	TOR	TOR+LOV	nombre
PRKAG2	1,01 1,06	1,11 0,65	0,97 0,75	0,70 0,53	0,56 0,57	0,67 0,93	0,88 0,82	protein kinase, amp-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
PPARGC1	1,20 1,09	0,80 0,61	0,61 0,95	0,51 0,54	0,37 0,52	0,59 1,03	0,66 0,94	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha
CDC2	1,21 1,04	0,78 0,67	0,68 0,73	0,51 0,61	0,55 0,64	0,65 0,89	0,77 0,78	cell division cycle 2, g1 to s and g2 to m
CDK2	0,03 0,18	-0,36 -0,48	-0,46 0,26	-1,07 -0,68	-1,1 -0,46	-0,53 0,12	-0,16 -0,18	cyclin-dependent kinase 2

Tabla 5. Genes cuya expresión disminuyó por efecto de los SERM y la LOV en células MOLT-4 (*cluster* 3). Se representa la relación de fluorescencia de la muestra tratada respecto a la de la muestra control de dos experimentos independientes.

De los 19 genes que aumentaron su expresión (**Tabla 4**), 16 son dianas de los SREBP. De ellos, 12 pertenecen a la ruta de biosíntesis de colesterol, regulada principalmente por SREBP-2. La función de estos genes en la ruta de biosíntesis de colesterol y su grado de expresión, así como el de los genes que no cumplieron los criterios de corte, se representan en las **Fig. 2, 3 y 4**. Por otro lado, destacaron otras dianas de SREBP como el LDLR - diana de SREBP-2 que codifica el rLDL -, SCD – diana de SREBP-1 que participa en la síntesis de ácidos grasos -, e INSIG1 - uno de los genes clave en la regulación del metabolismo lipídico por su interacción con los complejos Scap-SREBP -. De los cuatro genes del *cluster* 3, el de los genes reprimidos (**Tabla 5**), destaca PRKAG2, una proteína quinasa sensora de la energía celular que inhibe la síntesis de colesterol y ácidos grasos. También se encuentran reprimidos CDC2 y CDK2, genes implicados en el ciclo celular. En conjunto, estos resultados sugieren que los efectos de los SERM sobre el metabolismo de lípidos pueden estar mediados en buena parte por los SREBP.

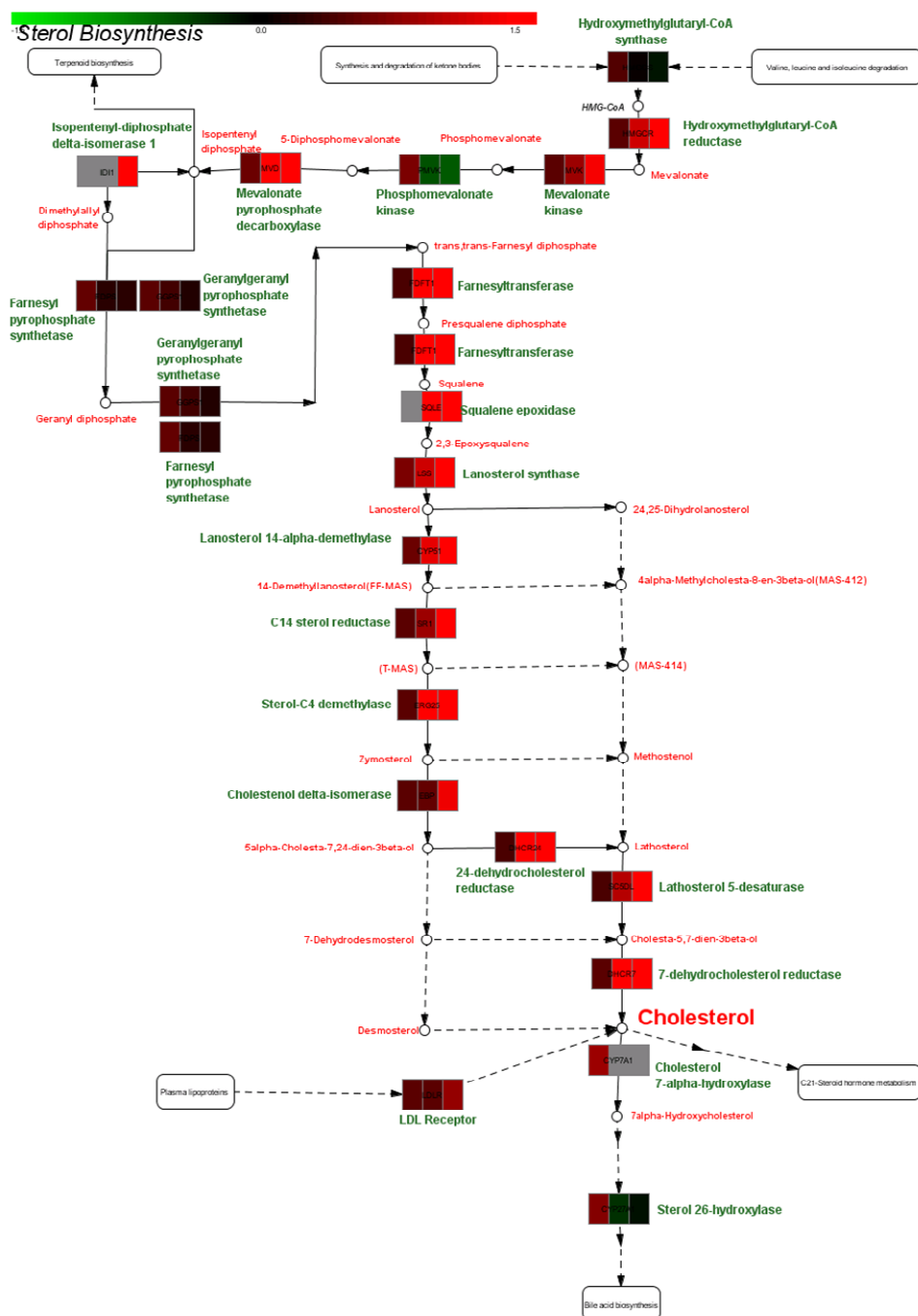


Figura 2. Representación de los cambios de expresión por efecto del TAM y la LOV sobre los genes de la ruta de biosíntesis de colesterol en células MOLT-4. Cada una de las cajas representa la expresión de una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol. A su vez, dentro de cada caja el primer, segundo y tercer color corresponden al resultado con LOV, TAM y la combinación de ambos, respectivamente. Se representa el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de un experimento representativo de dos. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura. El color gris denota la falta de detección de la expresión en el microarray.

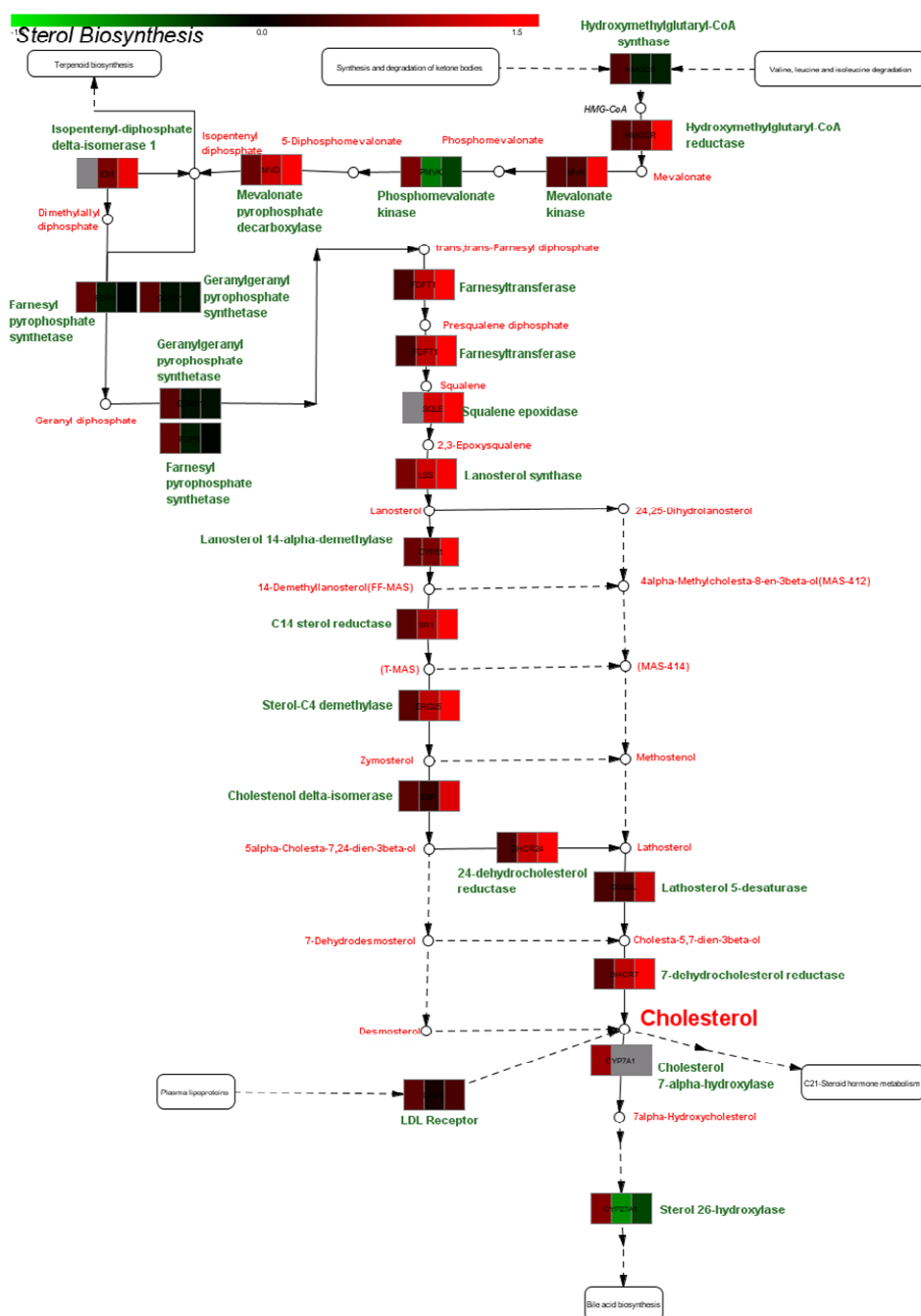


Figura 3. Representación de los cambios de expresión por efecto del RAL y la LOV sobre los genes de la ruta de biosíntesis de colesterol en células MOLT-4. Cada una de las cajas representa la expresión de una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol. A su vez, dentro de cada caja el primer, segundo y tercer color corresponden al resultado con LOV, TAM y la combinación de ambos, respectivamente. Se representa el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de un experimento representativo de dos. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura. El color gris denota la falta de detección de la expresión en el microarray.

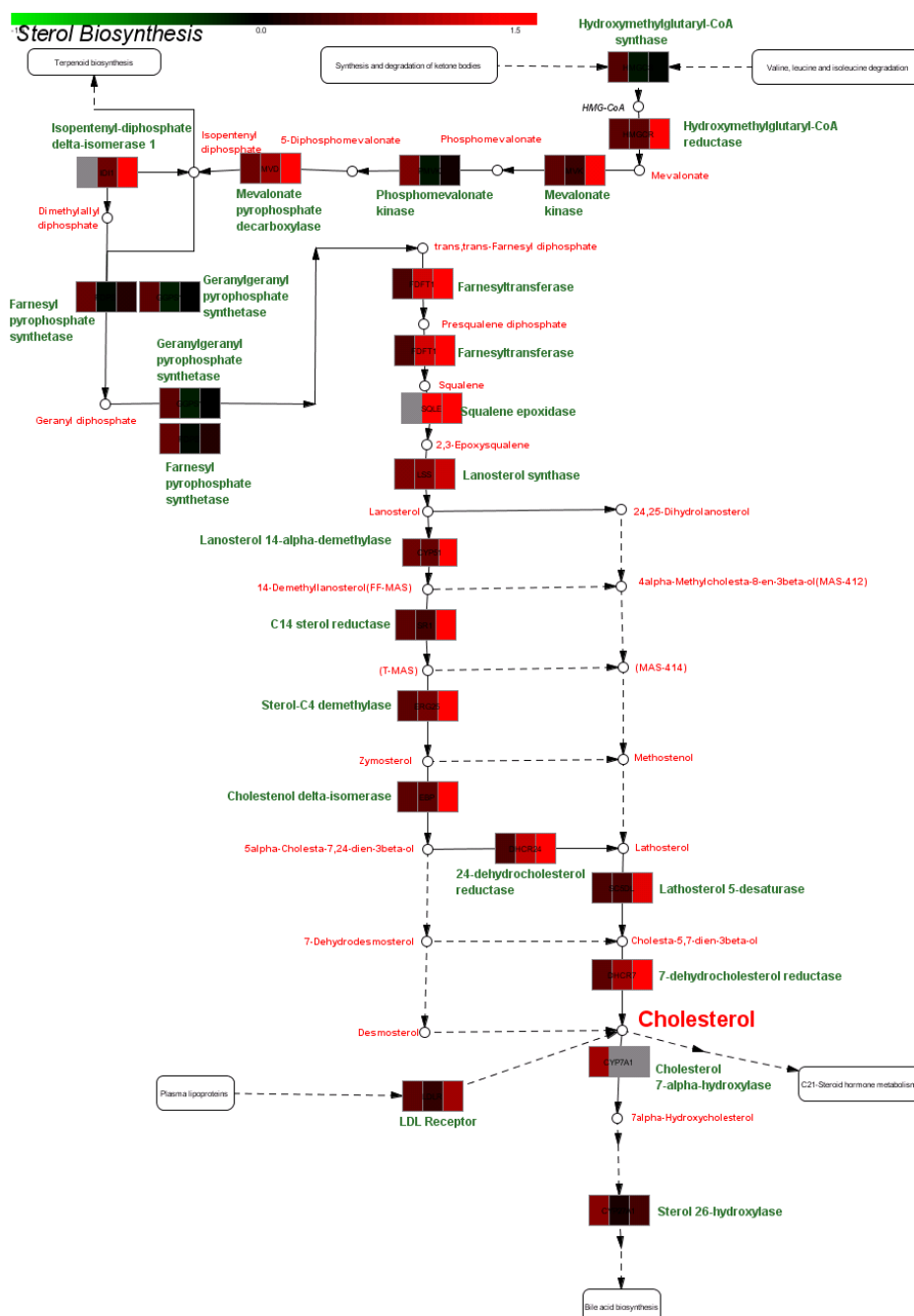


Figura 4. Representación de los cambios de expresión por efecto del TOR y la LOV sobre los genes de la ruta de biosíntesis de colesterol en células MOLT-4. Cada una de las cajas representa la expresión de una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol. A su vez, dentro de cada caja el primer, segundo y tercer color corresponden al resultado con LOV, TAM y la combinación de ambos, respectivamente. Se representa el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de un experimento representativo de dos. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura. El color gris denota la falta de detección de la expresión en el microarray.

1.2. Confirmación de los resultados del microarray mediante PCR en tiempo real en células MOLT-4.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante el microarray escogimos cinco genes representativos y dianas de los SREBP, como son LDLR, HMGCR, SCD, FDFT1 e INSIG1, y analizamos su expresión mediante PCR en tiempo real.

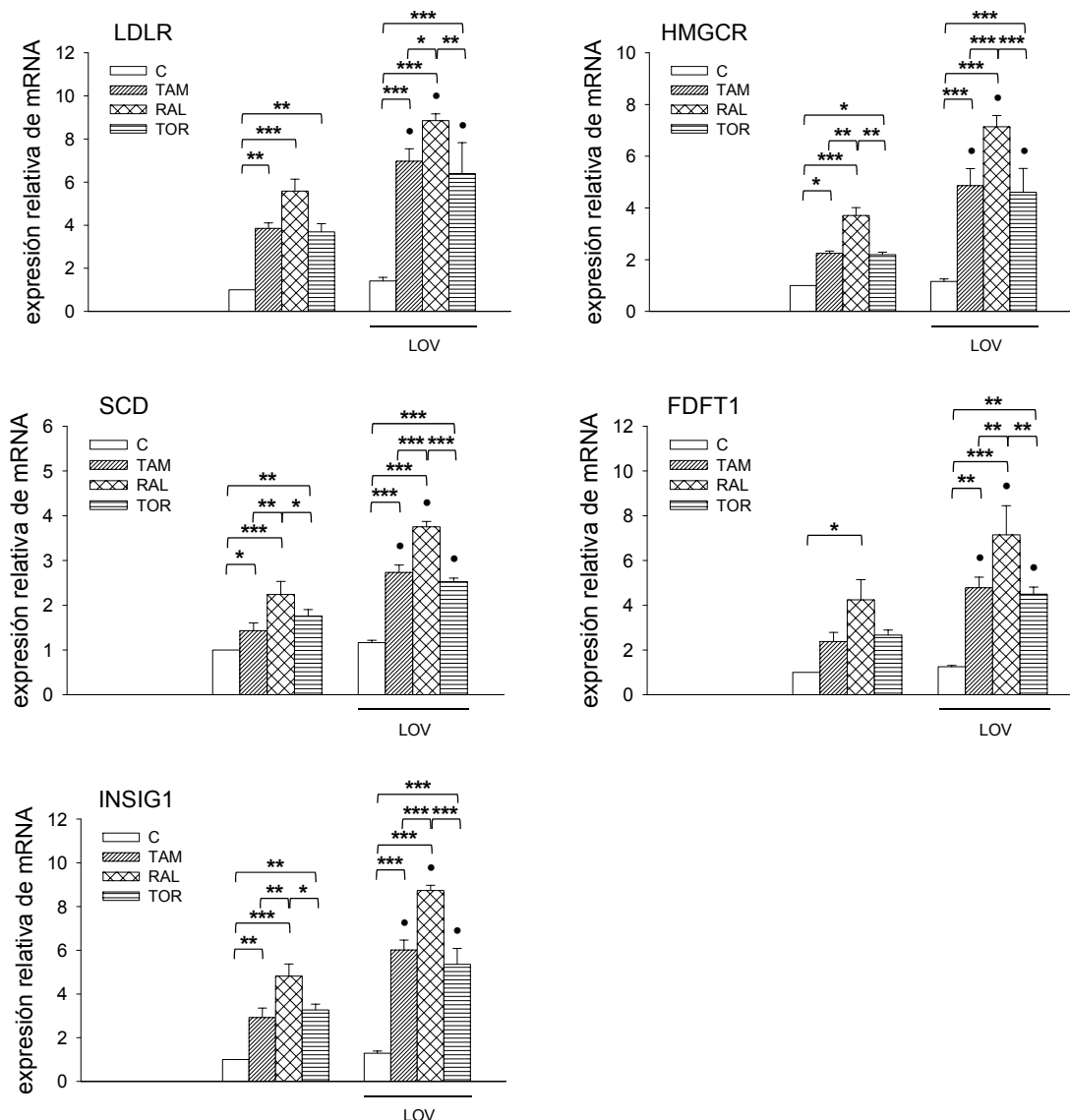


Figura 5. Confirmación de los cambios de expresión obtenidos con el microarray mediante PCR en tiempo real, en células MOLT-4. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs control; (•) $p < 0,05$ vs el tratamiento con el mismo SERM y sin LOV.

Como puede apreciarse en la **Fig. 5** la expresión de estos genes aumentó por efecto del TAM, RAL y TOR, siendo el RAL ligeramente más potente que los otros SERM. El tratamiento con LOV no cambió la expresión de estos genes respecto a la condición con LDL solas. Sin embargo, cuando se combinó la LOV con cualquiera de los SERM, la expresión de los cinco genes superó los efectos individuales de los respectivos SERM, lo que indica un efecto sinérgico entre ambos tipos de fármacos. De hecho, la interacción entre SERM y LOV fue estadísticamente significativa para LDLR, HMGCR, SCD, FDFT1 e INSIG1 ($p = 0,012$, $p = 0,004$, $p = 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,005$, respectivamente) (**Fig. 5**). En todos los casos los resultados obtenidos por PCR en tiempo real se corresponden con los obtenidos con el microarray.

1.3. *Análisis de los efectos de los SERM sobre la expresión génica en células HepG2 mediante microarrays*

Quisimos conocer si los efectos de los SERM observados en células MOLT-4 eran exclusivos de este tipo celular, linfoide, o si, por el contrario, se reproducían en un tipo celular tan importante en el metabolismo lipídico como son los hepatocitos. Para ello, utilizamos la línea de hepatocitos humanos HepG2. Las células se trataron con cada uno de los SERM en combinación o no con LOV siguiendo el mismo diseño experimental que con las células MOLT-4. De los 317 genes presentes en el microarray, 106 (33,4 %) se expresaron en todas las condiciones. De ellos, 71 (67,0 %) cambiaron su expresión significativamente en al menos una de las condiciones con el criterio de $M \geq 0,85$ o $M \leq -0,85$ (**Fig. 6**). Mediante análisis de *cluster* encontramos nuevamente cuatro conjuntos de genes con una respuesta similar entre sí. El primero de los *cluster* estaba constituido por genes que aumentaron mucho su expresión por efecto de los SERM, aumento que se potenciaba en las combinaciones con LOV. El segundo *cluster* contenía genes cuyo comportamiento era similar al anterior pero con cambios de expresión menos intensos. Estos dos *clusters* están representados en la **Tabla 6**. El tercer *cluster* estaba constituido por genes que se reprimían (**Tabla 7**). El último cluster estaba constituido por genes cuya expresión no cambiaba o tenía un comportamiento errático. Al igual que ocurrió con las células MOLT-4, no encontramos ningún grupo de genes que tuvieran un comportamiento diferencial entre los distintos SERM.

De los 24 genes estimulados significativamente en estas células, 10 son dianas de los SREBP. De éstos, 7 pertenecen a la ruta de biosíntesis de colesterol. La función de estos genes en la ruta de biosíntesis de colesterol y su grado de expresión, así como el de los genes que no cumplieron los criterios de corte, se representan en las **Fig. 7, 8 y 9**. Curiosamente, uno de los genes cuya expresión más cambió fue FABP1, un transportador de ácidos grasos que, aunque no se ha descrito que sea diana de los SREBP, tuvo un comportamiento similar a las dianas de estos. También aumentó la expresión de genes de varias apolipoproteínas, como APOC1, APOC3 y APOA5, y de los transportadores ABCG4 y ABCA8 (**Tabla 6**). En el *cluster* 3, encontramos tres genes reprimidos significativamente: MAPK8, que participa en la señalización de muchos procesos celulares; LIPIN1, una fosfatasa de ácido fosfatídico implicada en la biosíntesis de acilglicéridos y cuya disfunción causa lipodistrofia hepática; y HADHA, implicada en la beta-oxidación de ácidos grasos (**Tabla 7**). La disminución de la expresión tanto de LIPIN1 como de HADHA se puede relacionar con la esteatosis hepática que se ha descrito en pacientes que toman TAM [377].

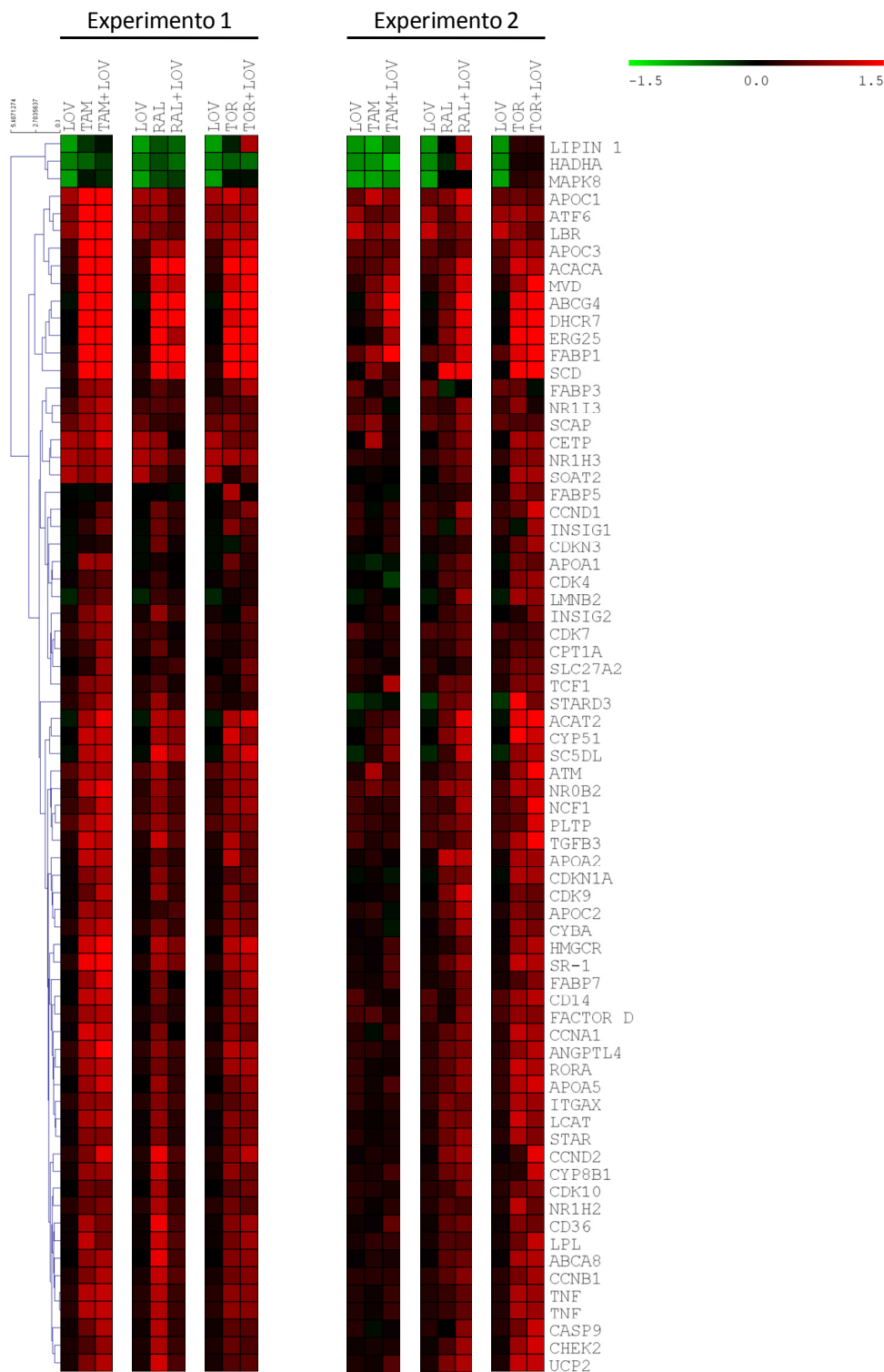


Figura 6. Análisis de los patrones de expresión mediante *cluster* de árbol jerárquico con distancias euclídeas en células HepG2 tratadas con cada uno de los SERM, LOV o sus combinaciones. Se representa, en escala de colores, el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de dos experimentos independientes. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura.

RESULTADOS

genes sobreexpresados								
acrónimo	LOV	TAM	TAM+LOV	RAL	RAL+LOV	TOR	TOR+LOV	nombre
APOC1	1,95 1,52	3,16 2,23	3,68 1,75	1,97 1,73	1,47 2,35	2,28 1,56	1,95 1,44	apolipoprotein C-I
ATF6	1,69 1,88	3,14 1,47	3,58 1,54	1,87 1,40	1,47 2,06	1,78 1,96	2,06 1,74	activating transcription factor 6 (endoplasmic reticulum stress)
LBR	1,79 2,23	2,97 1,69	3,34 1,97	1,62 1,51	1,42 1,74	2,08 1,75	2,00 1,42	lamin B receptor
APOC3	1,30 1,48	2,93 1,52	3,46 1,44	2,11 1,29	2,04 1,57	2,20 1,96	2,45 1,79	apolipoprotein C-III
ACACA	1,24 1,38	3,14 1,41	3,58 1,69	2,79 1,56	2,95 2,38	2,91 2,38	3,27 2,13	acetyl-CoA carboxylase alpha (fatty acid synthesis)
MVD	1,14 1,19	3,25 1,60	4,11 2,25	2,43 1,56	2,16 2,36	2,27 1,91	3,16 2,79	mevalonate (diphospho) decarboxylase
ERG25	1,02 1,02	2,83 1,15	3,34 1,93	3,61 1,71	1,99 2,48	3,20 3,07	3,56 3,78	sterol-c4-methyl oxidase-like
ABCG4	0,93 0,97	3,89 1,72	3,53 2,93	3,39 1,53	3,12 2,75	3,89 2,53	3,20 2,71	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4
DHCR7	1,01 1,09	4,17 1,45	4,14 2,46	3,27 1,66	2,75 2,64	2,45 2,64	3,78 3,58	7-dehydrocholesterol reductase
FABP1	1,12 1,43	3,86 1,95	3,97 2,79	3,61 1,57	4,11 2,43	4,08 2,50	4,86 2,77	fatty acid binding protein 1, liver
SCD	1,22 1,04	4,29 1,74	4,72 1,29	2,99 2,71	2,57 3,73	4,82 3,92	5,03 3,92	stearoyl-coa desaturase (delta-9-desaturase)
ACAT2	0,90 0,92	1,97 1,29	2,64 1,37	2,10 1,57	1,85 2,60	2,01 2,55	2,43 3,61	ACAT2 acetyl-CoA acetyltransferase 2
CYP51	1,01 1,02	2,23 1,30	2,25 1,68	1,97 1,69	1,73 2,27	2,36 2,95	1,80 2,33	lanosterol 14- α demethylase
SC5DL	0,95 0,85	2,07 1,19	2,27 1,72	2,58 1,27	1,95 2,23	1,96 1,80	2,43 2,10	sterol-C5-desaturase
ATM	1,39 1,15	1,95 2,00	2,03 1,27	2,04 1,38	1,30 1,66	1,84 1,89	1,93 2,99	ataxia telangiectasia mutated (cell cycle)
CCND2	1,16 1,05	1,68 1,14	2,51 1,13	2,64 1,74	1,38 1,95	1,69 1,27	2,16 2,55	cyclin D2
SR-1	1,16 1,13	2,62 1,06	3,07 1,40	1,97 1,46	1,64 1,91	1,96 2,23	2,10 2,06	transmembrane 7 superfamily member 2 (delta-14-reductase)
HMGCR	1,01 1,08	2,33 1,06	2,83 1,34	2,11 1,17	1,67 1,53	2,08 1,79	2,39 2,07	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase
ANGPTL4	1,22 1,22	2,07 1,20	2,79 1,12	1,77 1,55	1,31 1,66	2,08 1,78	2,00 2,13	angiopoietin-like 4
NR0B2	1,21 1,39	2,25 1,62	2,60 1,43	1,83 1,79	1,39 1,92	1,78 2,07	1,88 2,00	nuclear receptor subfamily 0, group b, member 2
TGFB3	1,17 1,39	2,31 1,15	2,16 1,27	2,27 1,30	1,41 1,62	2,04 2,04	1,49 2,75	transforming growth factor, beta 3
ABCA8	1,02 1,04	1,78 1,16	1,99 1,12	2,57 1,47	1,32 1,56	1,71 2,04	1,79 2,10	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8
APOA5	1,03 1,25	1,92 1,09	2,39 1,38	1,87 1,48	1,23 1,79	1,51 2,08	1,85 2,39	apolipoprotein A-V
UCP2	1,13 1,14	1,66 1,10	2,07 1,40	2,36 1,66	1,38 2,01	1,40 2,20	1,46 2,22	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)

Tabla 6. Genes cuya expresión aumentó por efecto de los SERM y la LOV en células HepG2 (*clusters* 1 y2). Se representa la relación de fluorescencia de la muestra tratada respecto a la de la muestra control de dos experimentos independientes. Aparecen en gris los nombres de los genes diana de los SREBP.

genes reprimidos								
acrónimo	LOV	TAM	TAM+LOV	RAL	RAL+LOV	TOR	TOR+LOV	nombre
LIPIN 1	0,52 0,54	0,81 0,48	0,92 0,62	0,72 0,99	0,66 2,00	0,88 1,22	2,00 1,20	lipin 1
HADHA	0,59 0,57	0,66 0,55	0,79 0,47	0,73 0,85	0,65 2,00	0,68 1,13	0,64 1,13	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase alpha subunit (beta-oxidation of long chain fatty acids)
MAPK8	0,52 0,52	0,91 0,52	0,84 0,57	0,73 0,99	0,78 1,03	0,94 1,20	0,93 1,27	mitogen-activated protein kinase 8

Tabla 7. Genes cuya expresión disminuyó por efecto de los SERM y la LOV en células HepG2 (*cluster* 3). Se representa la relación de fluorescencia de la muestra tratada respecto a la de la muestra control de dos experimentos independientes.

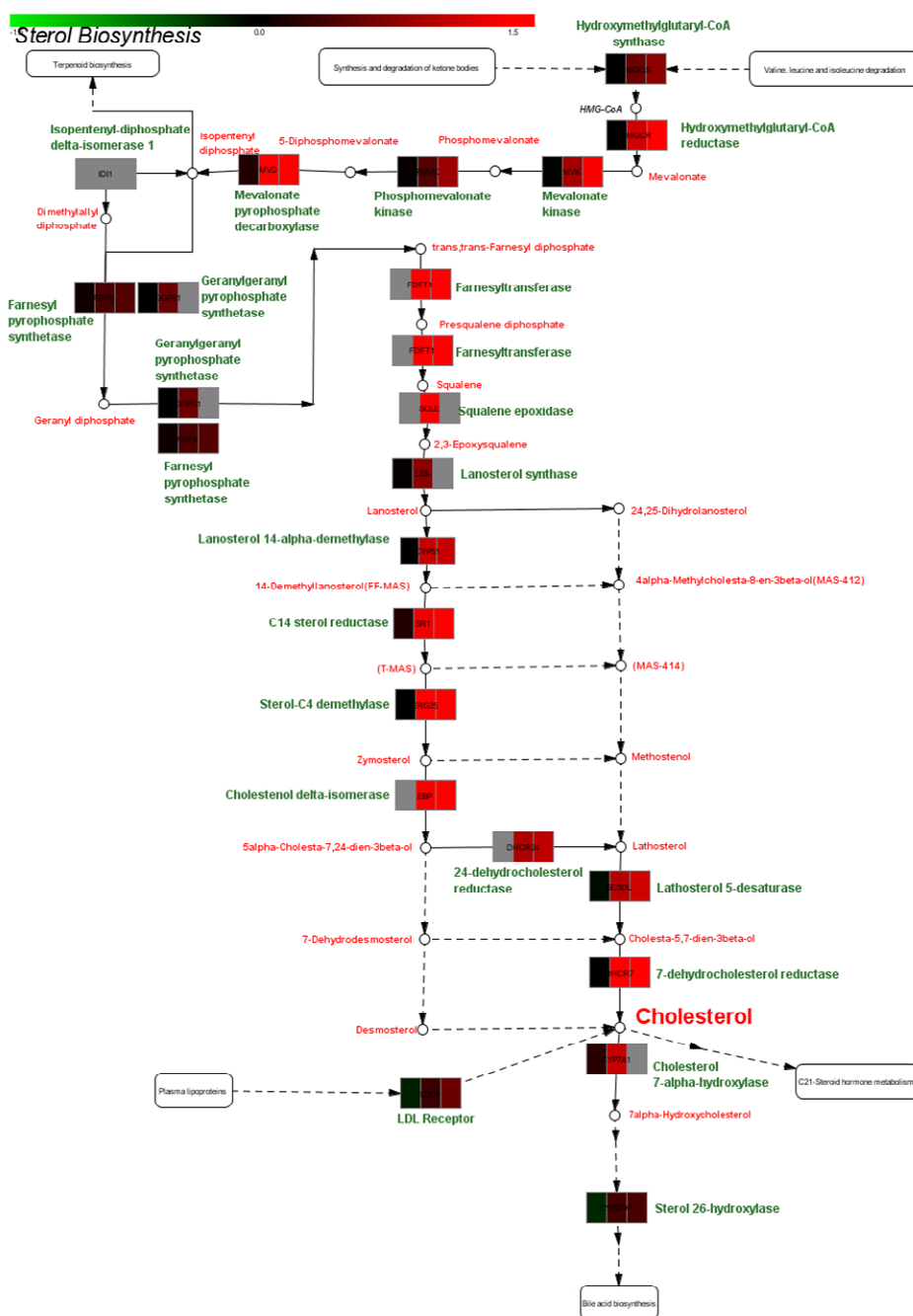


Figura 7. Representación de los cambios de expresión por efecto del TAM y la LOV sobre los genes de la ruta de biosíntesis de colesterol en células HepG2. Cada una de las cajas representa la expresión de una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol. A su vez, dentro de cada caja el primer, segundo y tercer color corresponden al resultado con LOV, TAM y la combinación de ambos, respectivamente. Se representa el log₂ (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de un experimento representativo de dos. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura. El color gris denota la falta de detección de la expresión en el microarray.

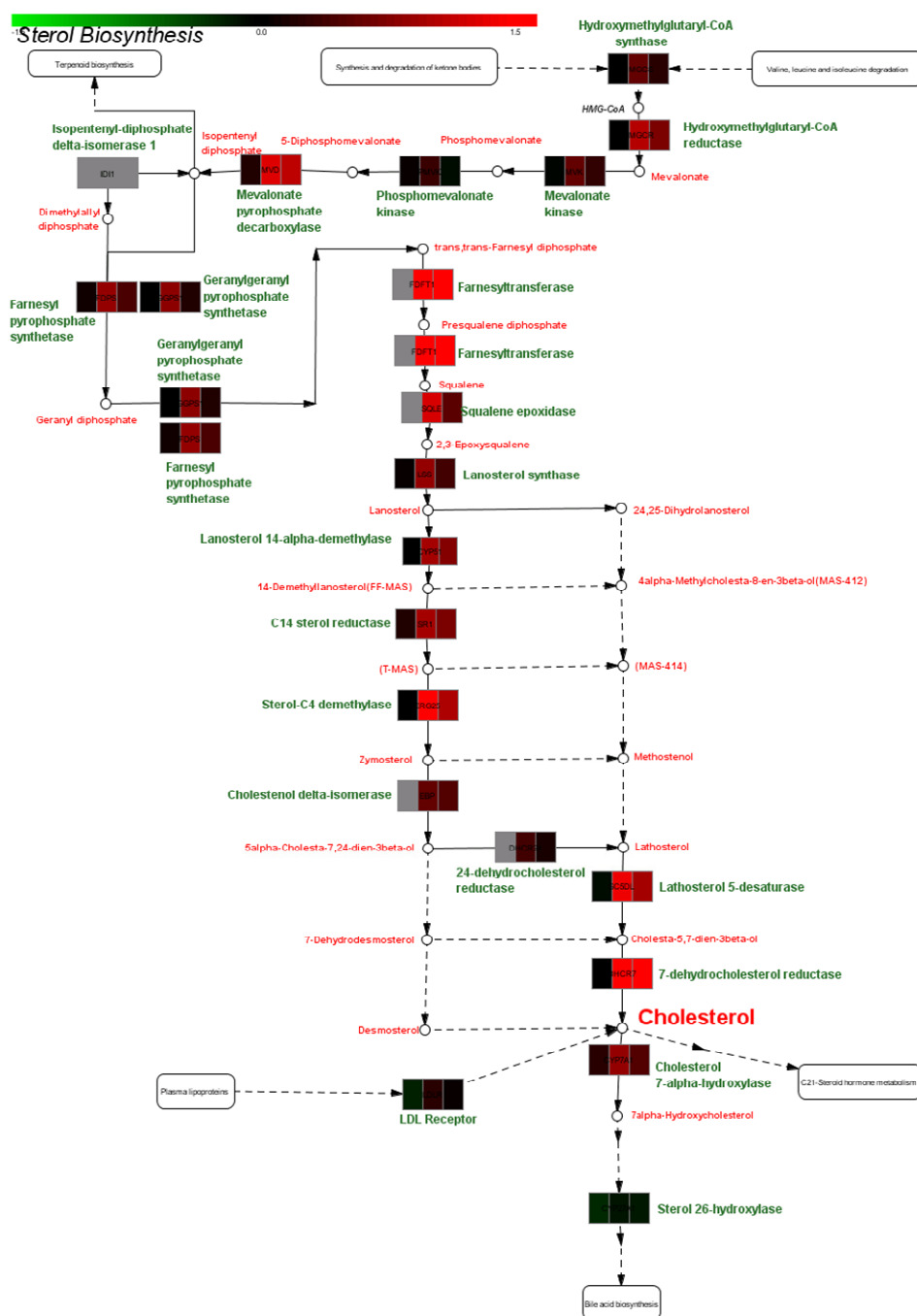


Figura 8. Representación de los cambios de expresión por efecto del RAL y la LOV sobre los genes de la ruta de biosíntesis de colesterol en células HepG2. Cada una de las cajas representa la expresión de una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol. A su vez, dentro de cada caja el primer, segundo y tercer color corresponden al resultado con LOV, TAM y la combinación de ambos, respectivamente. Se representa el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de un experimento representativo de dos. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura. El color gris denota la falta de detección de la expresión en el microarray.

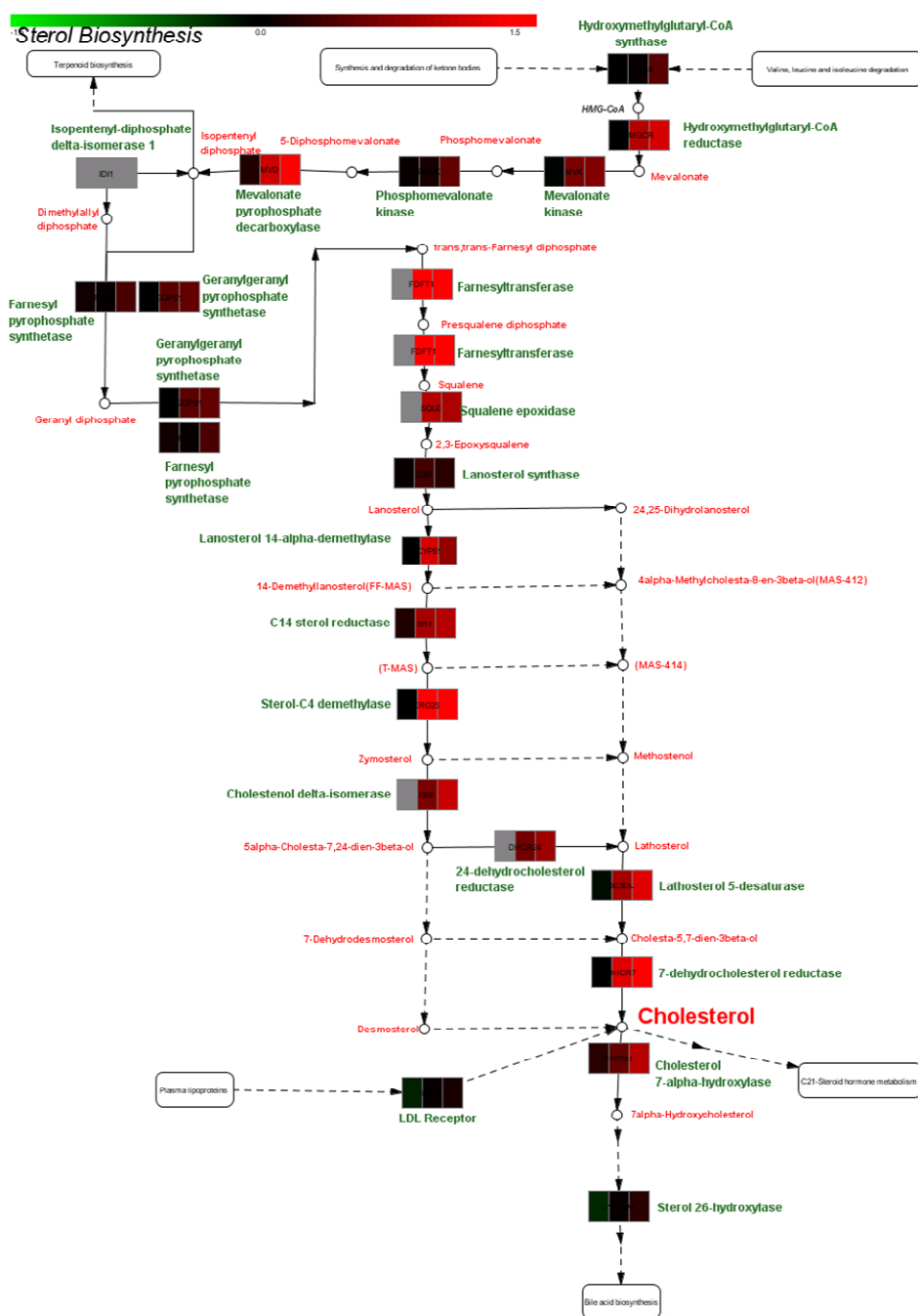


Figura 9. Representación de los cambios de expresión por efecto del TOR y la LOV sobre los genes de la ruta de biosíntesis de colesterol en células HepG2. Cada una de las cajas representa la expresión de una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de colesterol. A su vez, dentro de cada caja el primer, segundo y tercer color corresponden al resultado con LOV, TAM y la combinación de ambos, respectivamente. Se representa el \log_2 (fluorescencia muestra tratada/fluorescencia muestra control) de un experimento representativo de dos. El aumento de intensidad de rojo y verde corresponden al aumento o disminución de la expresión respectivamente, de acuerdo a la escala que aparece en la parte superior de la figura. El color gris denota la falta de detección de la expresión en el microarray.

1.4. Confirmación de los resultados del microarray mediante PCR en tiempo real en células HepG2

Para corroborar los resultados obtenidos mediante el microarray escogimos tres genes representativos de aquéllos cuya expresión se incrementó, como FABP1, MVD y ERG25, estos dos últimos dianas de SREBP-2, y analizamos su expresión mediante PCR en tiempo real. Al igual que ocurrió en las células MOLT-4, los resultados de la PCR en tiempo real se correlacionaron muy bien con aquellos del microarray. Las dianas de SREBP MDV y ERG5, que participan en la biosíntesis de colesterol, aumentaron su expresión por efecto de los SERM (**Fig. 10**). El tratamiento con LOV no modificó la expresión de estos genes respecto a la condición con LDL solas, pero, al igual que sucedió con las células MOLT-4, cuando la LOV se combinó con cualquiera de los SERM se produjo un efecto sinérgico entre ambos tipos de fármaco. Confirmamos también que FABP1 tenía un comportamiento muy similar al de las dianas conocidas de SREBP en respuesta a los SERM y la LOV (**Fig. 10**), mostrando asimismo un efecto sinérgico entre SERM y LOV (p (SERM x LOV) = 0,008).

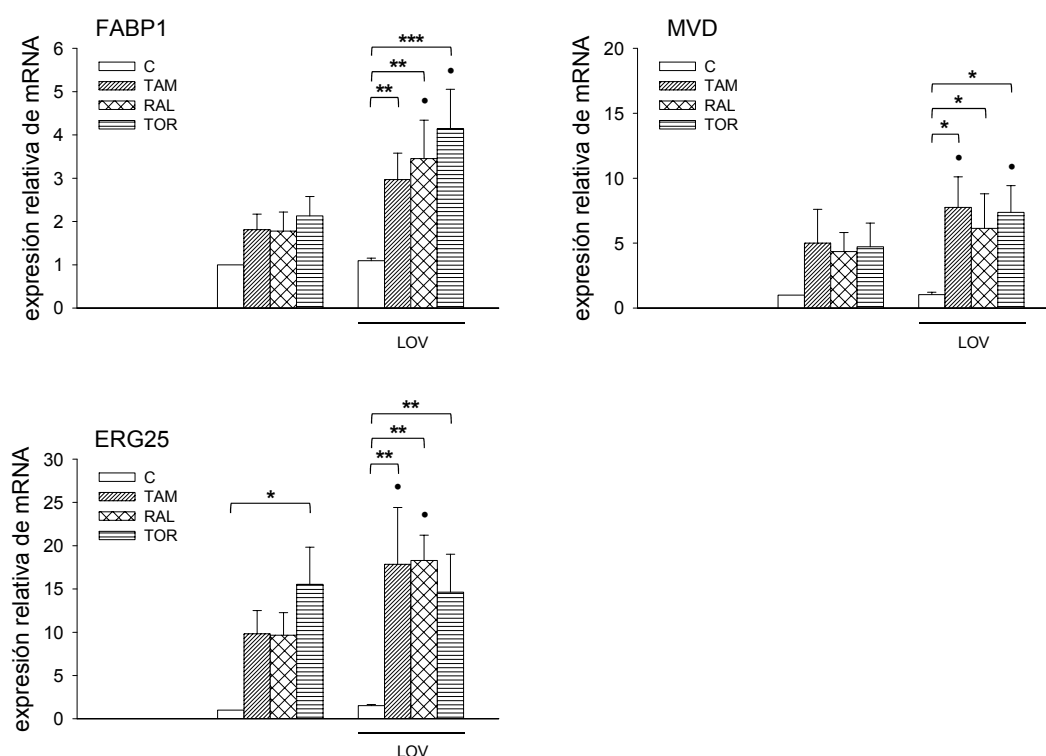


Figura 10. Confirmación de los cambios de expresión obtenidos con el microarray mediante PCR en tiempo real, en células HepG2. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs control; (•) $p < 0,05$ vs el tratamiento con el mismo SERM y sin LOV.

2. Estudio de los mecanismos implicados en el efecto de los SERM sobre la expresión génica

El estudio realizado con los microarrays nos reveló que los SERM estimulaban principalmente la expresión de un conjunto de genes que tenían como denominador común el ser dianas de los factores de transcripción SREBP, lo que sugiere la activación de esta vía. Por ello, nos preguntamos si los SERM inducían un aumento del procesamiento de SREBP-2, la isoforma más importante para el metabolismo del colesterol. También nos propusimos estudiar si la interferencia en el tráfico intracelular del colesterol lipoproteico descrita para el TAM en células MOLT-4 y HepG2 [334], y posible causa de la activación de dicha vía, se reproducía con RAL y TOR, no estudiados hasta el momento.

2.1. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el procesamiento de SREBP-2

Para estudiar el procesamiento de SREBP-2 comenzamos tratando las células HepG2 con TAM 10 μ M en presencia de LDL durante distintos tiempos. Además, como control positivo utilizamos la combinación de hidroxipropilciclodextrina al 0,1 % más LOV 1 μ M y en ausencia de LDL durante 2 h, condición que produce un rápido empobrecimiento de la célula en colesterol [378] y que, como consecuencia, estimula el procesamiento de los SREBP (**Fig. 11A**). El TAM produjo un aumento del procesamiento de SREBP-2, aunque este efecto no fue constante a lo largo del tiempo (**Fig. 11A**). Así, a las 12 h se observó un incremento de la proporción de la forma madura o nuclear de SREBP-2 (nSREBP-2). A las 15 h, la forma precursora de SREBP-2 (pSREBP-2) prácticamente desapareció y la cantidad de nSREBP-2 alcanzó valores máximos. Finalmente, a las 18 h se revirtió el efecto, ya que disminuyó la proporción de nSREBP-2 hasta cantidades comparables a las de la condición control y aumentó la cantidad de pSREBP-2 respecto a la que había a las 15 h (**Fig. 11A**), probablemente también como consecuencia de la activación de SREBP-2, que estimula la transcripción de su propio gen.

Partiendo de estos datos, escogimos las 15 h de tratamiento para ampliar el estudio a los otros SERM y sus combinaciones con LOV. Como era de esperar dada la presencia de LDL en el medio, en la condición control observamos casi todo el SREBP-2 en su forma no procesada (**Fig. 11B**). La adición de cualquiera de los SERM produjo un incremento significativo del procesamiento de SREBP-2. La adición de LOV sola no aumentó el procesamiento de SREBP-2 respecto a la condición control, probablemente debido al predominio del efecto represor de las LDL. Sin embargo, cuando la LOV se combinó con cualquiera de los SERM se observó un incremento en el procesamiento de SREBP-2 mucho mayor que el producido por los SERM solos (**Fig. 11B**). Esto es indicativo de un efecto sinérgico entre los dos tipos de fármacos que se manifiesta no solo en el procesamiento de SREBP-2 sino, recordemos, también en la expresión de sus genes diana (**Tabla 4 y Fig. 5**). El hecho de que se produzcan ambos efectos indica una muy probable relación causa efecto entre el aumento de la cantidad de factor de transcripción activo y el aumento de la expresión de sus genes diana.

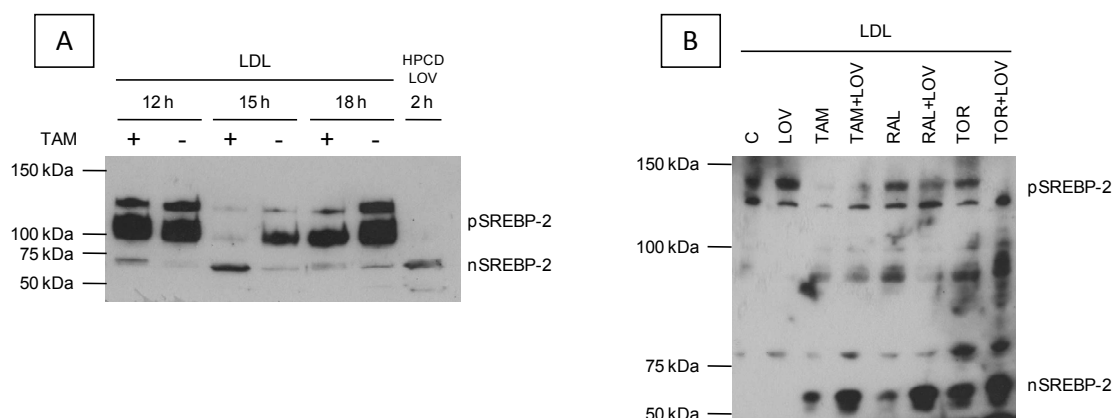


Figura 11. Efecto de los SERM sobre el procesamiento de SREBP-2 en células HepG2 mediante *western blot*. A: tratamiento con TAM durante varios tiempos. HPCD, hidroxipropilciclodextrina. B: tratamiento con los SERM, LOV o combinaciones de estos durante 15 h. Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes.

2.2. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el tráfico intracelular del colesterol lipoproteico

Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si el RAL y el TOR interferían en el tráfico intracelular de colesterol y si este efecto se potenciaba en presencia de LOV, como se conoce que ocurre con TAM. Para ello, tratamos las células MOLT-4 con cada uno de los SERM en combinación o no con LOV y en presencia de LDL durante 24 h. Luego las células se fijaron y se tiñeron con filipina, un antibiótico con elevada afinidad por el colesterol libre.

La filipina tiñó las células control así como las tratadas con LOV de una manera difusa, concentrándose levemente en lo que probablemente constituye el complejo de Golgi (**Fig. 12**). En cambio, en las células tratadas con cualquiera de los SERM se observó la aparición de gránulos citoplasmáticos con una intensa fluorescencia. Estos gránulos aumentaron en cantidad y tamaño en las células tratadas con la combinación de SERM y LOV (**Fig. 12**). Dichos acúmulos vesiculares son característicos de una deficiencia en la salida de colesterol de endosomas tardíos/lisosomas, tal y como sucede en la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C [131]. Nuestros resultados demuestran que, al igual que el TAM, el RAL y el TOR interrumpen el tráfico intracelular del colesterol suministrado en forma de LDL, quedando el mismo acumulado en endosomas tardíos/lisosomas.

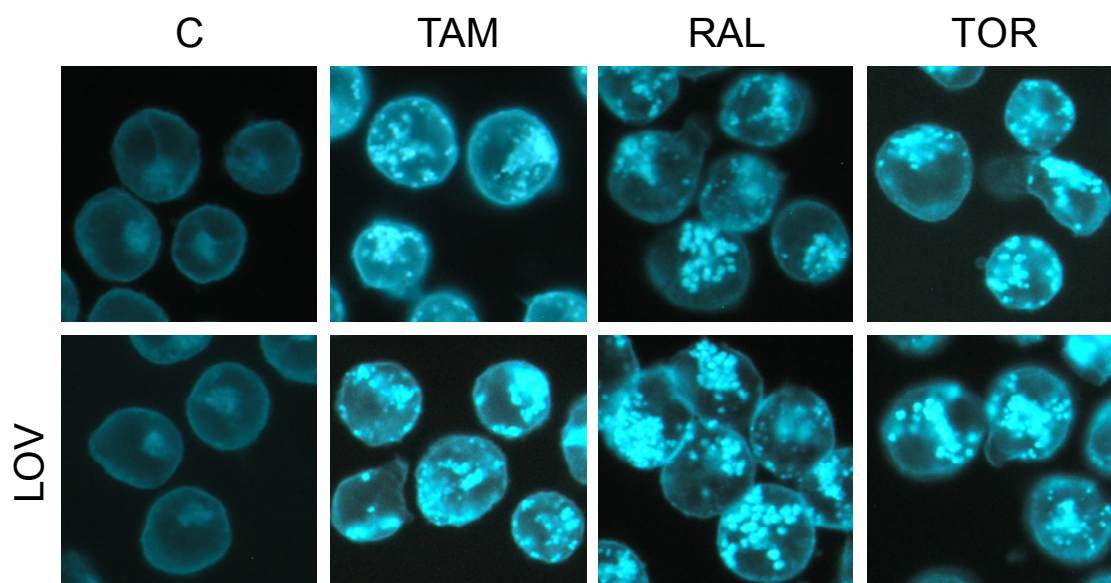


Figura 12. Efecto de los SERM sobre la distribución intracelular de colesterol en células MOLT-4 tratadas con los distintos SERM y con o sin LOV. Las células se tiñeron con filipina y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes.

Para comprobar que la inhibición del tráfico intracelular de colesterol por efecto del TAM, como representante de los tres SERM, no ocurría solo en la línea linfoblástica MOLT-4 sino también en otros tipos celulares, incubamos hepatocitos HepG2, células de la línea monocítica THP-1 diferenciadas a macrófagos y macrófagos primarios humanos (MPH) con TAM o vehículo en presencia de LDL durante 24 h. La tinción de las células control fue difusa y reticular (**Fig. 13**). Sin embargo, la adición de TAM produjo en todos los casos la formación de vesículas citoplasmáticas que contenían acúmulos de colesterol, de manera similar a lo que ocurría en las células MOLT-4.

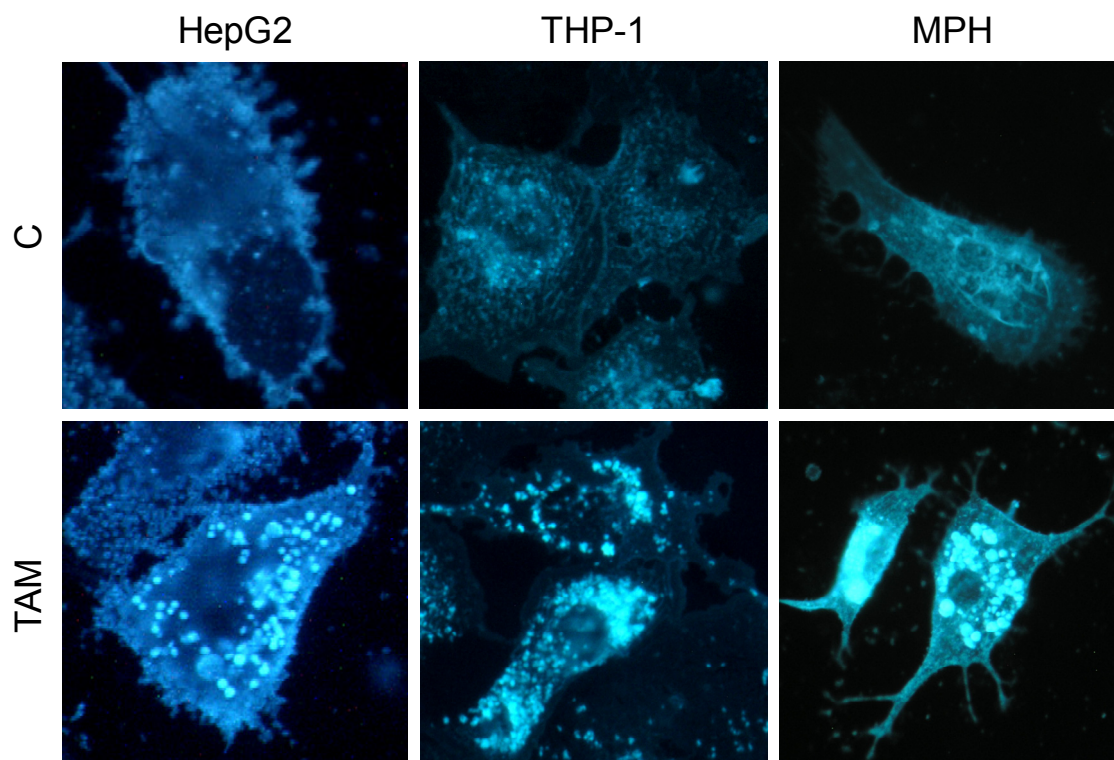


Figura 13. Efecto del TAM sobre la distribución intracelular de colesterol en distintos tipos celulares. Las células se tiñeron con filipina y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes con cada tipo celular.

2.3. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión génica y el tráfico intracelular de colesterol en función de la fuente de colesterol exógeno

El procesamiento por la vía endosomal es el propio de las LDL captadas por las células mediante el rLDL (ver apartado 3.1 de la Introducción). Como acabamos de comprobar, los tres SERM estudiados interrumpen el tráfico intracelular del colesterol procedente de las LDL, hecho que coincide con un aumento del procesamiento de SREBP-2 y de la expresión de sus genes diana. Nos preguntamos, por tanto, si los SERM tendrían los mismos efectos si el colesterol se administrase en forma no lipoproteica, el cual se distribuye en la célula mediante mecanismos distintos a la vía endosomal. Para ello, nos auxiliamos de complejos de colesterol y metilciclodextrina (ColMCD), ampliamente utilizados para ceder eficientemente colesterol a las células por una vía independiente del rLDL [378-380]. Tratamos las células MOLT-4 con cada uno de los SERM o vehículo combinados o no con LOV y en presencia de LDL o, alternativamente, de ColMCD durante 24 h. A continuación, analizamos la expresión de varios genes diana de SREBP-2 y de ABCA1, diana de LXR. La cantidad de colesterol añadida con ColMCD se ajustó de forma que

la magnitud del efecto producido sobre las dianas de SREBP-2 estudiadas fuese comparable a la del efecto producido por las LDL. Por ello, pusimos además una condición sin colesterol en el medio (LPDS) y, por otra parte, LPDS con LOV como referencias.

Comenzaremos por la expresión de las dianas de SREBP en presencia de LDL. Como era de esperar, la adición de LDL al medio disminuyó la expresión de LDLR, HMGCR e INSIG1 respecto a la condición con solo LPDS (**Fig. 14**). La expresión de estos genes aumentó por efecto del TAM, RAL y TOR, o dicho de otra manera, los tres SERM se opusieron a la represión causada por la adición de LDL (**Fig. 14**). El tratamiento con LOV no cambió la expresión de LDLR, HMGCR e INSIG1 respecto a la condición con LDL solas, lo que sugiere el predominio del efecto represor de las LDL. Sin embargo, cuando aquélla se combinó con cualquiera de los SERM, la expresión de los tres genes aumentó respecto a su condición control, y este aumento fue mayor que con los correspondientes SERM solos (**Fig. 14**), lo que indica un efecto sinérgico entre ambos tipos de fármaco. Estos efectos de SERM y LOV coinciden con los mostrados anteriormente para estos mismos genes (**Tabla 4 y Fig. 5**).

Cuando a las células se les suministró ColMCD, que recordemos no se transporta por la vía endosomal, observamos una disminución de la expresión de los tres genes respecto al LPDS, la cual fue comparable a la producida por las LDL, tanto en presencia como en ausencia de LOV (**Fig. 14**). La adición de los SERM o sus combinaciones con LOV no produjo en ningún caso cambio alguno en la expresión génica respecto al producido por el ColMCD solo (**Fig. 14**), lo cual contrasta con lo observado al exponer las células a LDL. De hecho, encontramos sendas interacciones significativas entre los SERM y la fuente de colesterol (SERM x colesterol) para LDLR, HMGCR e INSIG1, tanto en ausencia ($p = 0,016$, $p = 0,009$ y $p = 0,036$, respectivamente) como en presencia de LOV ($p = 0,012$, $p = 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente). Estos resultados indican que el efecto de los SERM sobre la expresión de los genes diana de SREBP es dependiente de la fuente de colesterol exógeno, de manera que aquél tiene lugar cuando a las células se les suministra colesterol en forma de LDL, pero no cuando se les suministra colesterol no lipoproteico.

La expresión de ABCA1, diana de LXR, tuvo un comportamiento completamente diferente al de las dianas de SREBP. Cuando añadimos colesterol en forma de LDL la expresión de ABCA1 no cambió respecto al LPDS solo. La LOV, per sé, disminuyó dicha expresión, efecto al que se opusieron las LDL (**Fig. 14**). La adición de los distintos SERM causó en todos los casos una intensa represión de la expresión de ABCA1 respecto a su condición control sin SERM, independientemente de la combinación con LOV. Cuando se añadió ColMCD como fuente de colesterol se incrementó la expresión de ABCA1 respecto al LPDS, tanto en ausencia como en presencia de LOV (**Fig. 14**). En estas condiciones los SERM también reprimieron la expresión de ABCA1, aunque en menor grado que cuando la fuente de colesterol fueron las LDL (**Fig. 14**). La interacción entre los SERM y la fuente de colesterol fue estadísticamente significativa en ausencia de LOV ($p = 0,024$), pero en presencia de este fármaco no alcanzó significación estadística (**Fig. 14**).

RESULTADOS

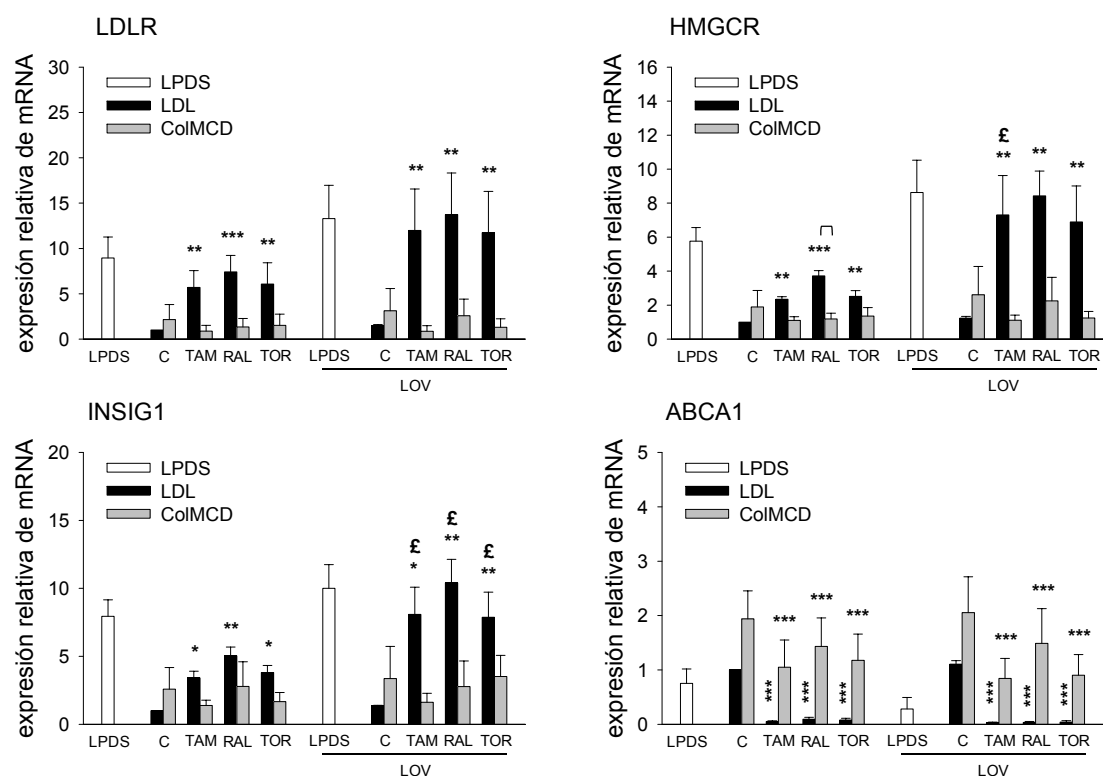


Figura 14. Efecto de los SERM y sus combinaciones con LOV sobre la expresión génica en presencia de 120 o 1,16 μg de colesterol/ml en forma de LDL o ColMCD, respectivamente, en células MOLT-4. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la condición con LDL solas, a la que se dio valor uno, tras normalizar por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto a la misma condición sin SERM, £ $p < 0,05$ respecto a la misma condición sin LOV, □ $p < 0,05$ respecto a la misma condición con diferente fuente de colesterol exógeno.

Si los SERM no afectaban a la expresión de los genes diana de SREBP cuando el colesterol exógeno suministrado no seguía la vía endosomal, sería de esperar que dicho colesterol no quedase acumulado en el citoplasma por efecto de aquellos fármacos. Para comprobarlo, tratamos las células MOLT-4 en idénticas condiciones a las utilizadas anteriormente y luego las fijamos y teñimos con filipina para analizar la distribución del colesterol.

En presencia de LDL, las células tratadas con SERM y sus combinaciones con LOV mostraron los acúmulos citoplasmáticos de colesterol (**Fig. 15**) previamente descritos. Cuando las células se incubaron con ColMCD solo o con LOV, la tinción apareció difuminada, al igual que en las tratadas con LDL solas (**Fig. 15**). La adición de cualquiera de los SERM o sus combinaciones con LOV no indujo en ningún caso la aparición del fenotipo observado al suministrar LDL (**Fig. 15**). Estos resultados sugieren que los SERM solo afectan significativamente al transporte de

colesterol por la vía endosomal, provocando que este se acumule en endosomas tardíos/lisosomas.

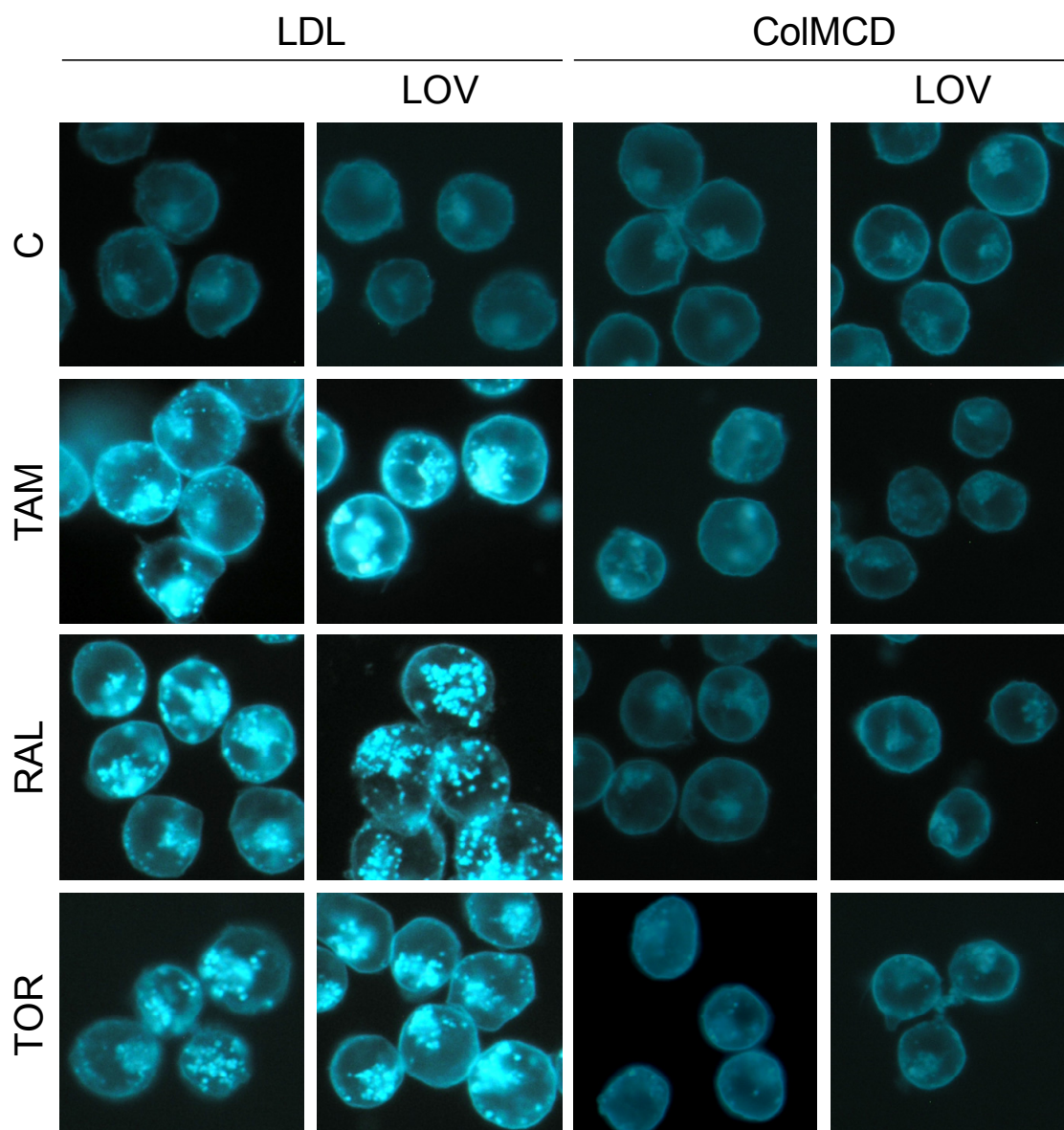


Figura 15. Efecto de los SERM sobre la distribución intracelular de colesterol en células MOLT-4 tratadas con los distintos SERM con o sin LOV y en presencia de 120 o 1,16 $\mu\text{g/ml}$ de colesterol en forma de LDL o CoIMCD, respectivamente. Las células se tiñeron con filipina y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes.

Para conocer si los efectos derivados del uso de diferentes fuentes de colesterol exógeno eran exclusivos de las células MOLT-4 o si, por el contrario, había un mecanismo más general, reproducimos el anterior experimento en células HepG2. En estas células estudiamos el gen SCD, también diana de SREBP, en lugar de INSIG1, el cual apenas se expresaba. Al igual que ocurrió en las células MOLT-4, la adición de colesterol en forma de LDL reprimió la expresión de LDLR,

RESULTADOS

HMGCGR y SCD respecto a la condición con LPDS solo y, además, los tres SERM se opusieron a dicha represión (**Fig. 16**). El tratamiento con LOV no modificó la expresión de estas dianas de SREBP respecto a la condición con LDL solas. Sin embargo, cuando la LOV se combinó con cualquiera de los SERM se produjo un aumento de expresión mayor que el inducido por los correspondientes SERM solos, sugeriendo de un efecto sinérgico entre ambos tipos de fármaco (**Fig. 16**); el término de interacción SERM x LOV alcanzó significación estadística para HMGCGR ($p = 0,039$). En esencia, por tanto, los SERM y la LOV produjeron sobre LDLR, HMGCGR y SCD efectos similares a los producidos sobre otras dianas de SREBP analizadas anteriormente (**Tabla 6 y Fig. 10**).

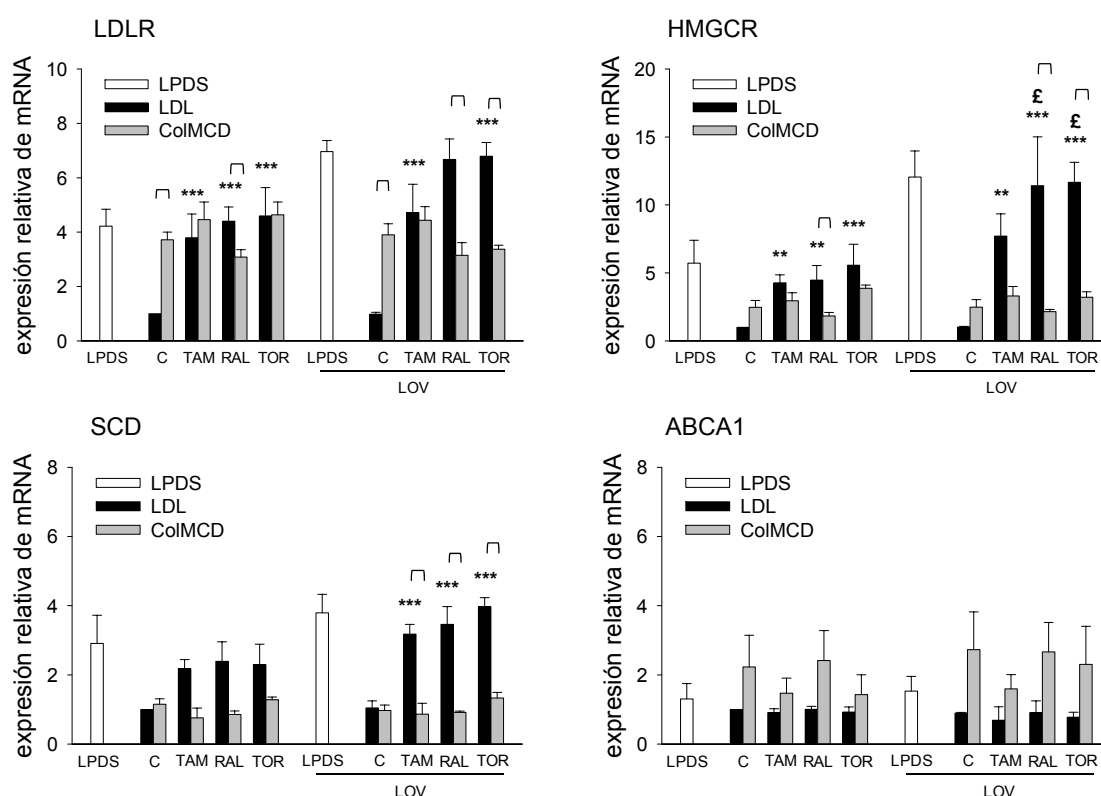


Figura 16. Efecto de los SERM y sus combinaciones con LOV sobre la expresión génica en presencia de 120 o 30 μg de colesterol/ml en forma de LDL o ColMCD, respectivamente, en células HepG2. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la condición con LDL solas, a la que se dio valor uno, tras normalizar por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto a la misma condición sin SERM; £ $p < 0,05$ respecto a la misma condición sin LOV; ¶ $p < 0,05$ respecto a la misma condición con diferente fuente de colesterol exógeno.

Cuando a las células HepG2 se les suministró ColMCD observamos una disminución de la expresión de HMGCR y SCD respecto al LPDS, pero, curiosamente, no sobre la expresión de LDLR (**Fig. 16**), a pesar de que la concentración de ColMCD utilizada fue ≈ 26 veces la empleada con las células MOLT-4. La adición de los SERM o sus combinaciones con LOV no produjo en ningún caso cambios en la expresión génica respecto al producido por el ColMCD solo (**Fig. 16**). Así, nuevamente encontramos interacciones significativas o cercanas a la significación estadística entre los SERM y la fuente de colesterol exógeno (SERM x colesterol) para LDLR, HMGCR y SCD, tanto en ausencia ($p = 0,002$, $p = 0,018$ y $p = 0,066$, respectivamente) como en presencia de LOV ($p < 0,001$, $p = 0,012$ y $p = 0,007$, respectivamente). Estos resultados amplían a las células HepG2 la dependencia del efecto de los SERM respecto a la fuente de colesterol exógeno, ejerciéndose dicho efecto sobre las dianas de SREBP sólo cuando el colesterol transita en la célula por la vía endosomal.

Los cambios de expresión de ABCA1 por efecto de los SERM se distinguieron otra vez de los de las dianas de SREBP. La adición de LDL no produjo ningún cambio de expresión significativo respecto al LPDS solo. En estas células, y de manera distinta a lo ocurrido con las células MOLT-4, los SERM o sus combinaciones con LOV no ejercieron ningún efecto en presencia de LDL (**Fig. 16**). Cuando añadimos ColMCD observamos un incremento de la cantidad del mRNA de ABCA1, tanto en ausencia como en presencia de LOV, que no llegó a ser significativo respecto a la condición con LDL. En estas condiciones, TAM y TOR mostraron cierta tendencia a oponerse a la estimulación de la expresión génica producida por ColMCD, aunque este efecto tampoco llegó a ser estadísticamente significativo.

Para profundizar en el estudio del papel de las fuentes de colesterol, analizamos una tercera línea celular, los monocitos humanos THP-1 diferenciados a macrófagos, tipo celular que posee un especial metabolismo del colesterol (apartado 6 de la Introducción). En estas células, los SERM también estimularon la expresión de los genes diana de SREBP al suministrar LDL y se mostraron inactivos en presencia de ColMCD (**Fig. 17**), pero presentaron ciertas peculiaridades respecto a las líneas MOLT-4 y HepG2. Así, las LDL fueron menos activas inhibiendo la expresión de dichos genes que en las anteriores células. En este contexto, el tratamiento con los distintos SERM igualó o superó el grado de expresión génica propio del LPDS. Además, la combinación de cualquiera de los SERM con LOV no resultó en un aumento adicional en la expresión de ninguno de los tres genes respecto al obtenido con los SERM solos. Por otro lado, la expresión de ABCA1 no varió, o lo hizo levemente, en respuesta a los SERM en las distintas condiciones estudiadas.

Analizando globalmente los datos de las tres líneas celulares podemos decir que los SERM estimulan en todas ellas la expresión de los genes diana de SREBP y que estos cambios son dependientes de la fuente de colesterol exógeno, puesto que requieren el suministro de LDL. La adición de LOV puede aumentar de manera sinérgica el efecto producido por los SERM, si bien esta sinergia es dependiente del tipo celular. El gen ABCA1, diana de LXR, tiene una respuesta a los SERM completamente diferente a la de las dianas de SREBP y la cual es variable en función del tipo celular, pudiendo dichos fármacos inhibir o no tener efecto sobre la expresión de aquel gen.

RESULTADOS

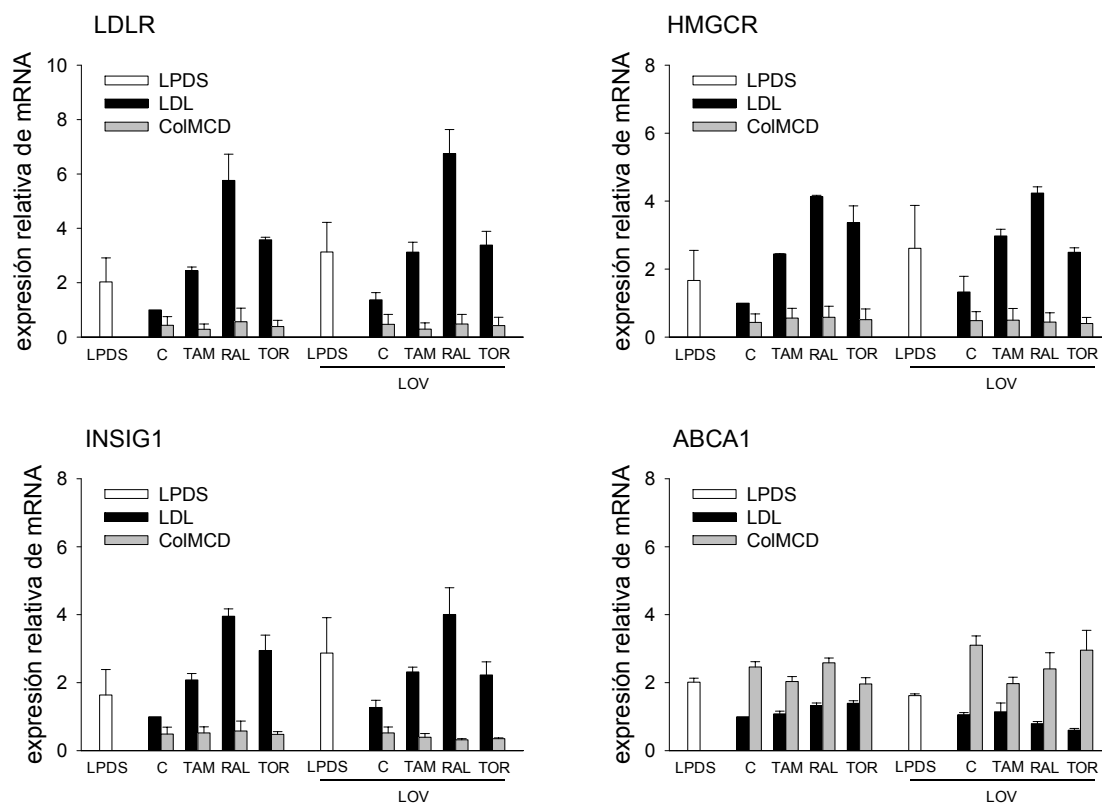


Figura 17. Efecto de los SERM y sus combinaciones con LOV sobre la expresión génica en presencia de 120 o 11,6 $\mu\text{g/ml}$ de colesterol en forma de LDL o ColIMCD, respectivamente, en macrófagos THP-1. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la condición con LDL solas, a la que se dio valor uno, tras normalizar por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

Los resultados presentados hasta aquí sugieren que los SERM afectan la disponibilidad del colesterol que transita por la vía endosomal y que ello altera la capacidad de éste para ejercer sus efectos reguladores. Lo mismo ocurre en la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, que tiene su origen en defectos en los genes de NPC1 o NPC2, dos moléculas que se encargan de exportar el colesterol contenido en los endosomas tardíos/lisosomas. Por tanto, para discernir si el defecto en el tráfico en las células tratadas con SERM podía deberse a una disminución de la expresión de dichos transportadores decidimos medir su expresión génica en nuestras condiciones experimentales. Para ello, tratamos células MOLT-4 y HepG2 con los distintos SERM combinados o no con LOV y en presencia de LDL durante 15 h.

Como se muestra en la **Fig. 18**, en las células MOLT-4 los SERM, lejos de disminuir la expresión génica de NPC1 y NPC2, la aumentaron levemente. Por otro lado, la combinación con LOV aumentó ligeramente dichos efectos (**Fig. 18**).

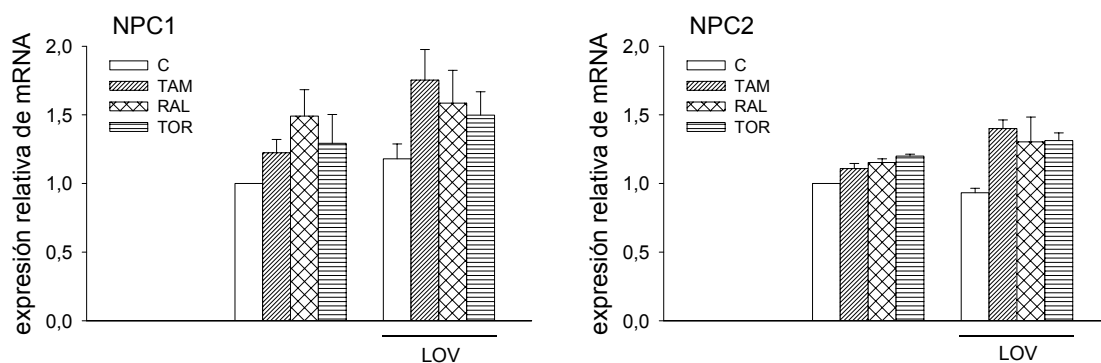


Figura 18. Efecto de los SERM y sus combinaciones con LOV sobre la expresión de los genes NPC1 y NPC2 en células MOLT-4. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

Para confirmar los resultados anteriores repetimos el ensayo con células HepG2 (**Fig. 19**). Los tres SERM incrementaron moderadamente la expresión de NPC1 y NPC2, produciendo un efecto similar en ausencia y en presencia de LOV (**Fig. 19**). Estos resultados sugieren que la disfunción del tráfico intracelular de colesterol inducida por los SERM no se debe a la disminución de la expresión de los transportadores NPC1 o NPC2.

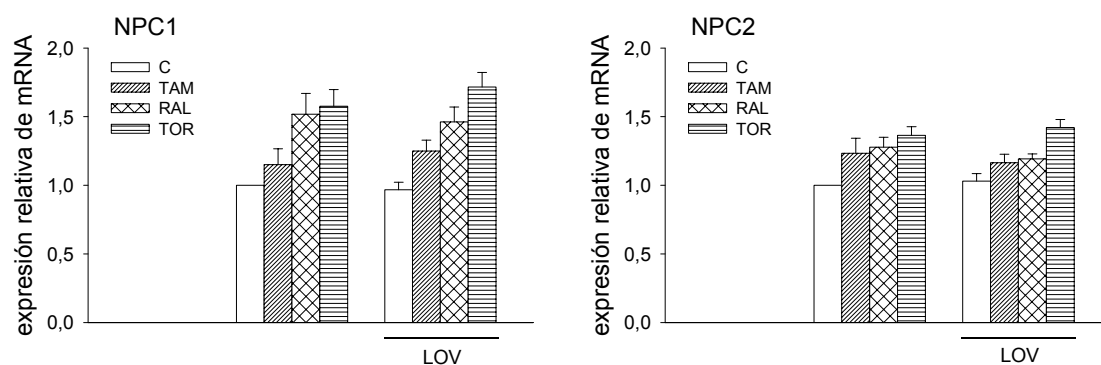


Figura 19. Efecto de los SERM y sus combinaciones con LOV sobre la expresión de los genes NPC1 y NPC2 en células HepG2. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

2.4. *Papel de los receptores de estrógenos en los efectos de los SERM*

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) son, como su nombre indica, un conjunto de moléculas capaces de interactuar con los ER actuando como agonistas o antagonistas de los mismos, aunque también pueden tener efectos independientes de aquéllos. Sería posible, entonces, que algunos de los efectos observados en nuestro estudio estuviesen mediados por dichos receptores. Para abordar esta cuestión comenzamos por estudiar la expresión de los genes del ER α (ESR1) y ER β (ESR2) en las células MOLT-4, HepG2 y THP-1 diferenciadas a macrófagos.

La expresión tanto de ESR1 como de ESR2 en las células HepG2 y THP-1 fue indetectable. Las curvas de amplificación de ambos genes aparecían a más de 39 ciclos (CP > 39) y, por tanto, por debajo del límite de detección de la PCR en tiempo real. Por otro lado, en células MOLT-4, ESR1 tampoco se expresó en cantidad suficiente como para ser detectado, teniendo una CP mayor de 40 ciclos. Sin embargo, el mRNA de ESR2 se encontró en cantidades muy pequeñas, aunque muy próximas al límite de detección (CP=30). Estos resultados indican que nuestras líneas celulares no expresan mRNA del ER α y solo las células MOLT-4 expresan mRNA del ER β , aunque en muy pequeña cantidad.

A pesar de los resultados de expresión de los ER, quisimos medir la respuesta de algunos de sus genes diana al tratamiento con TAM o a un amplio rango de dosis de 17 β -estradiol (E2), el ligando natural de aquéllos, tal y como se especifica en Materiales y Métodos. En las células MOLT-4, la expresión de ESR2 mostró una ligera tendencia descendente a medida que aumentó la dosis de E2, mientras que ninguna de las dosis de hormona tuvo efecto sobre la expresión de BCL2 y LDLR, también posible diana de los ER (**Fig. 20**). El tratamiento con TAM no afectó a la expresión de BCL2 y ESR2, y solo tuvo un ligero efecto estimulador sobre LDLR (**Fig. 20**).

En las células HepG2 los genes diana de los ER TFF1, FOXA1 y LDLR no respondieron a ninguna de las dosis de E2 (**Fig. 21**). El único efecto notable observado en este ensayo fue el aumento de la expresión de LDLR en las células tratadas con TAM (**Fig. 21**).

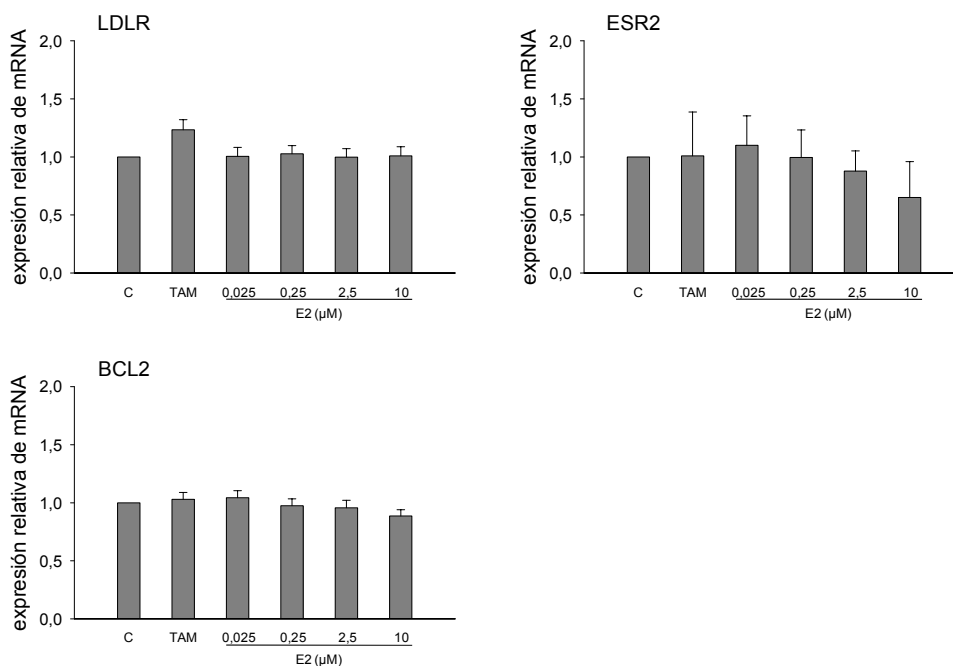


Figura 20. Efecto del TAM y dosis crecientes de E2 sobre la expresión de genes diana de los ER en células MOLT-4. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

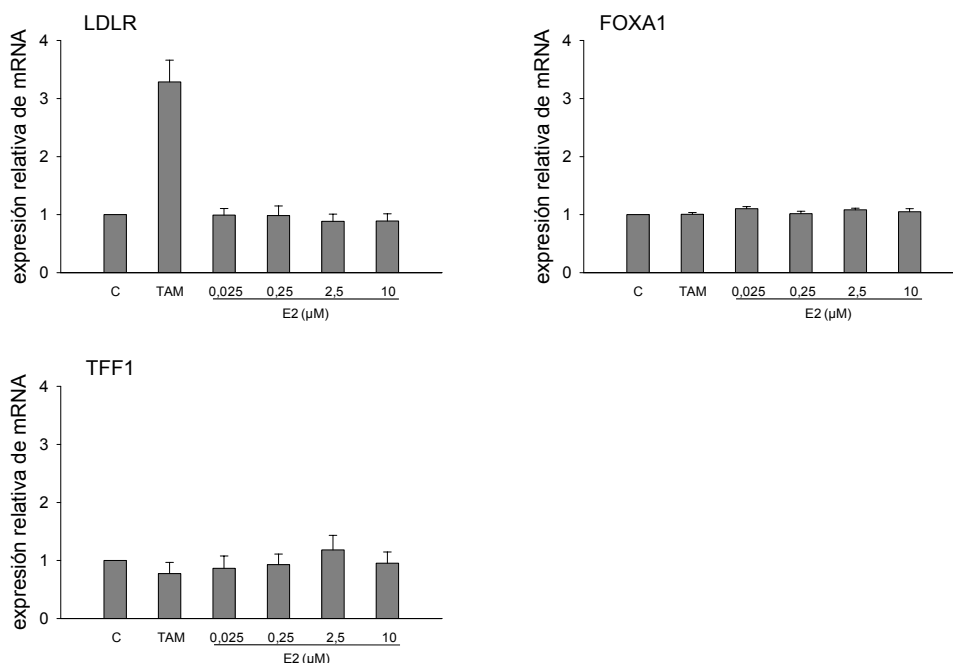


Figura 21. Efecto del TAM y dosis crecientes de E2 sobre la expresión de genes diana de los ER en células HepG2. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

RESULTADOS

Los anteriores resultados en las células MOLT-4 y HepG2 son coherentes con la deficiencia de éstas en la expresión de ESR1 y ESR2. Una nueva aproximación para comprobar que los efectos de los SERM no estaban mediados por los ER fue analizar el efecto del inhibidor de los ER ICI 182,780 (ICI), a concentración 1 μ M, sobre las células MOLT-4 tratadas con E2 o con cada uno de los SERM. La expresión de BCL2 no respondió al tratamiento con ninguna de las dos dosis de E2 empleadas ni con ninguno de los SERM (**Fig. 22**). La adición del inhibidor ICI no influyó en la expresión de dicho gen en ninguna de las anteriores condiciones. La cantidad del mRNA de ESR2 no cambió cuando se trataron las células con SERM respecto a las células no tratadas, aunque con RAL dicha cantidad fue significativamente más baja que con TOR (**Fig. 22**). Cuando se añadió el inhibidor de los ER, no se observó efecto alguno sobre el correspondiente grado de expresión en ausencia de aquél (**Fig. 22**). Finalmente, la expresión de LDLR no cambió cuando añadimos E2 a las células, mientras que sí lo hizo de manera significativa cuando añadimos cada uno de los SERM. La adición de ICI no alteró los anteriores efectos (**Fig. 22**). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los efectos de los SERM que hemos observado en nuestro estudio son independientes de los ER.

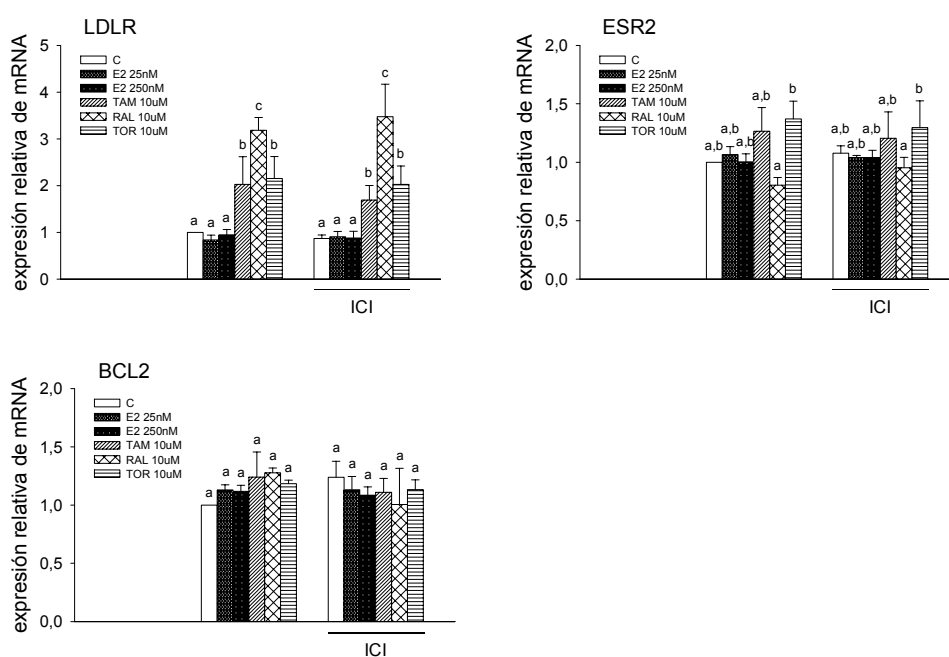


Figura 22. Efecto de E2 y los SERM sobre la expresión de genes diana de los ER en células MOLT-4. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; entre las barras con distinta letra existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

2.5. Efecto de los SERM sobre la expresión génica en macrófagos THP-1 en presencia de LDL modificadas

En animales, la inmensa mayoría de los tipos celulares utilizan LDL nativas; sin embargo, los macrófagos son capaces de captar, además, LDL modificadas químicamente, proceso que es importante en el desarrollo de la placa de ateroma. La captación de LDL modificadas, como son las LDL-Ox o las LDL-Ac (un modelo de LDL modificada utilizado *in vitro*), tiene lugar mediante mecanismos distintos al rLDL, como son los receptores *scavenger*, y, tras su captación, las distintas LDL aparecen en lisosomas diferentes [381, 382]. Nos propusimos, por tanto, comparar el efecto del TAM sobre macrófagos incubados en presencia de LDL nativas o modificadas. Para ello, los macrófagos THP-1 se trataron con TAM 10 μ M o vehículo y en presencia de idéntica cantidad (120 μ g de colesterol/ml) de LDL nativas, oxidadas en menor (LDL-Ox1) o mayor grado (LDL-Ox2) o LDL-Ac durante 15 y 24 h. También pusimos, como referencia, una condición con LPDS sin adiciones. Terminados los tratamientos medimos la expresión de varios genes de interés.

Comenzamos analizando la expresión de genes que son dianas establecidas de SREBP, como LDLR, HMGCR, FDFT1, DHCR24, SCD y SREBF2 (**Fig. 23**). Las LDL y LDL-Ac reprimieron la expresión de todos estos genes respecto al LPDS, si bien en distinto grado en función del gen; LDLR y SREBF2 mostraron, respectivamente, el mayor y menor grado de inhibición por dichas partículas, siendo los efectos más intensos a las 24 h de tratamiento. El TAM incrementó la expresión de estos genes en presencia tanto de LDL como de LDL-Ac (**Fig. 23**). Por su parte, las LDL-Ox solo redujeron sustancialmente la expresión de LDLR, pero la adición de TAM apenas tuvo efecto sobre esta expresión, y, en general, fue poco efectiva sobre la de los otros genes (**Fig. 23**). También analizamos la expresión génica de los transportadores NPC1 y NPC2. Como se muestra en la **Fig. 23**, las distintas LDL tuvieron un efecto moderado pero diferencial sobre la expresión de NPC1: LDL y LDL-Ac redujeron su expresión, mientras que LDL-Ox1 y LDL-Ox2 la aumentaron. Sin embargo, el tratamiento con TAM incrementó dicha expresión en presencia de cualquiera de los tipos de LDL, aunque los mayores efectos se obtuvieron en las combinaciones con LDL y LDL-Ac. Esta respuesta al TAM es similar a la de las dianas de SREBP y, de hecho, NPC1 se ha propuesto como diana tanto de SREBP-1 como de SREBP-2 [137]. En cuanto a NPC2, no se observaron cambios significativos en su expresión con ninguno de los tratamientos (**Fig. 23**). Así pues, el TAM produjo efectos similares sobre la expresión génica de las dianas de SREBP cuando a los macrófagos THP-1 se les suministran LDL o LDL-Ac, las cuales inhibieron regularmente la expresión de dichas dianas. Sin embargo, el TAM resultó poco efectivo cuando a las células se les suministraron LDL-Ox, cuyo efecto sobre la expresión de las dianas de SREBP es variable de un gen a otro.

RESULTADOS

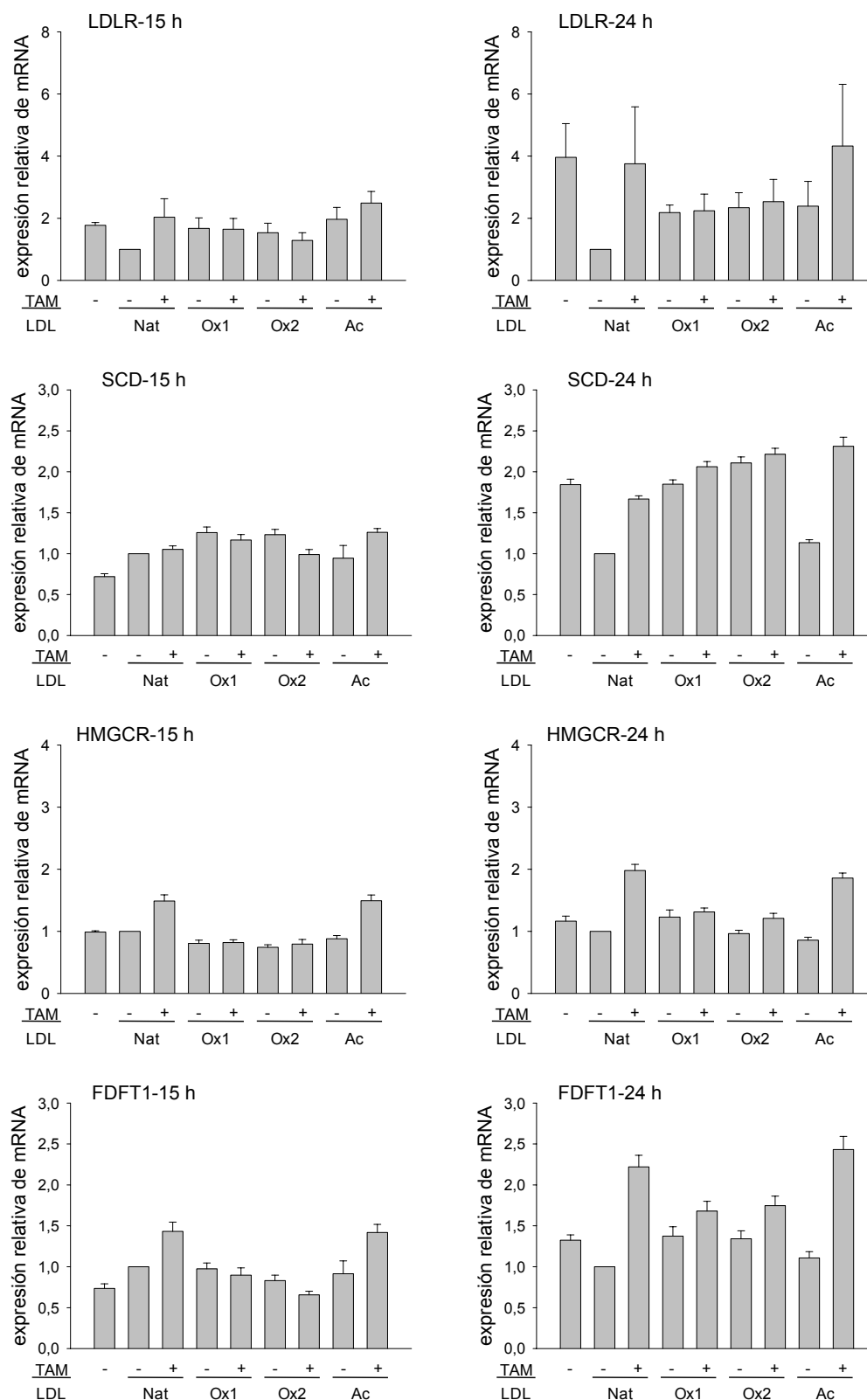


Figura 23. Pie en la siguiente página.

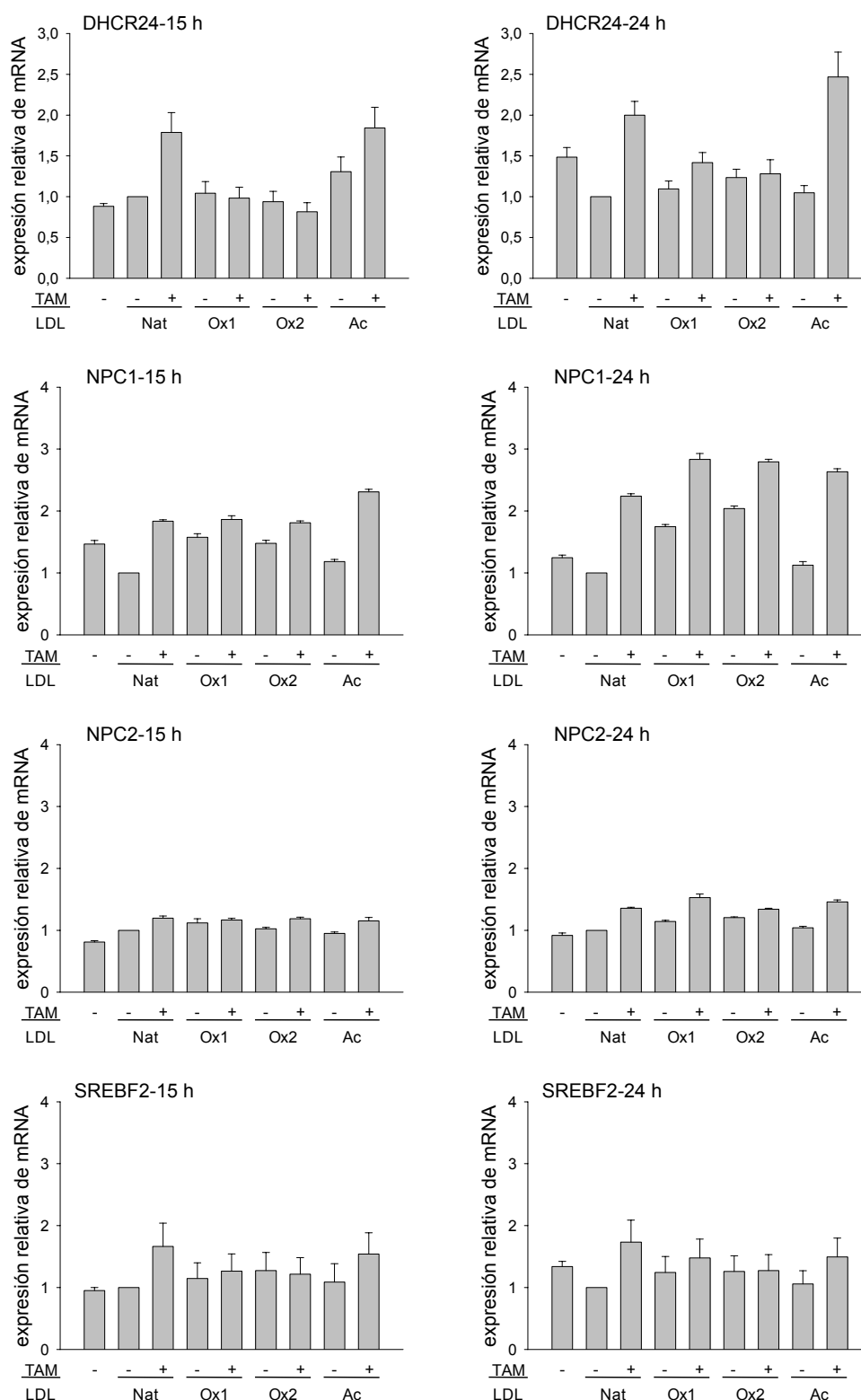


Figura 23. Efecto del TAM en presencia de distintos tipos de LDL sobre la expresión de genes diana de SREBP y la expresión de NPC2 en macrófagos THP-1. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la condición con LDL nativas (Nat) solas, a la que se dio valor uno, tras normalizar por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

Pasando a las dianas de LXR, la expresión de ABCA1 y ABCG1 aumentó cuando se añadió cualquiera de las LDL modificadas, en mayor medida para ABCG1 a las 15 h de tratamiento, mientras que, curiosamente, disminuyó al añadir LDL (**Fig. 24**). La adición de TAM redujo la expresión de ambos genes con cada tipo de LDL, pero especialmente con LDL-Ac y LDL-Ox (**Fig. 24**). En términos generales, estas respuestas al tratamiento con el SERM se asemejaron a las observadas para SREBF1C (**Fig. 24**), también diana de LXR. Los cambios en la expresión total de SREBF1, que incluye la de sus dos posibles transcritos SREBF1C y SREBF1A, fueron similares a los de SREBF1C, pero mitigados. Estudiamos, además, otra diana de LXR que codifica una molécula que también puede participar en la exportación del colesterol del macrófago, como es APOE. Si bien la expresión de este gen se vio claramente estimulada por el tratamiento con las LDL-Ox, el TAM no la redujo, sino que incluso la aumentó (**Fig. 24**). Por último, analizamos los efectos sobre otro gen implicado en la exportación del colesterol del macrófago, como SCARB1, que codifica el receptor CLA-1/SR-BI. En algunos tipos celulares se ha descrito como diana de LXR, pero su comportamiento como tal no es general [383]. Los tratamientos con las distintas LDL y el TAM no indujeron cambios relevantes en la expresión de SCARB1 (**Fig. 24**). Por lo tanto, salvedad hecha de APOE y SCARB1, el TAM reprimió la expresión de las dianas de LXR en un efecto que es común al suministro de LDL, LDL-Ac y LDL-Ox.

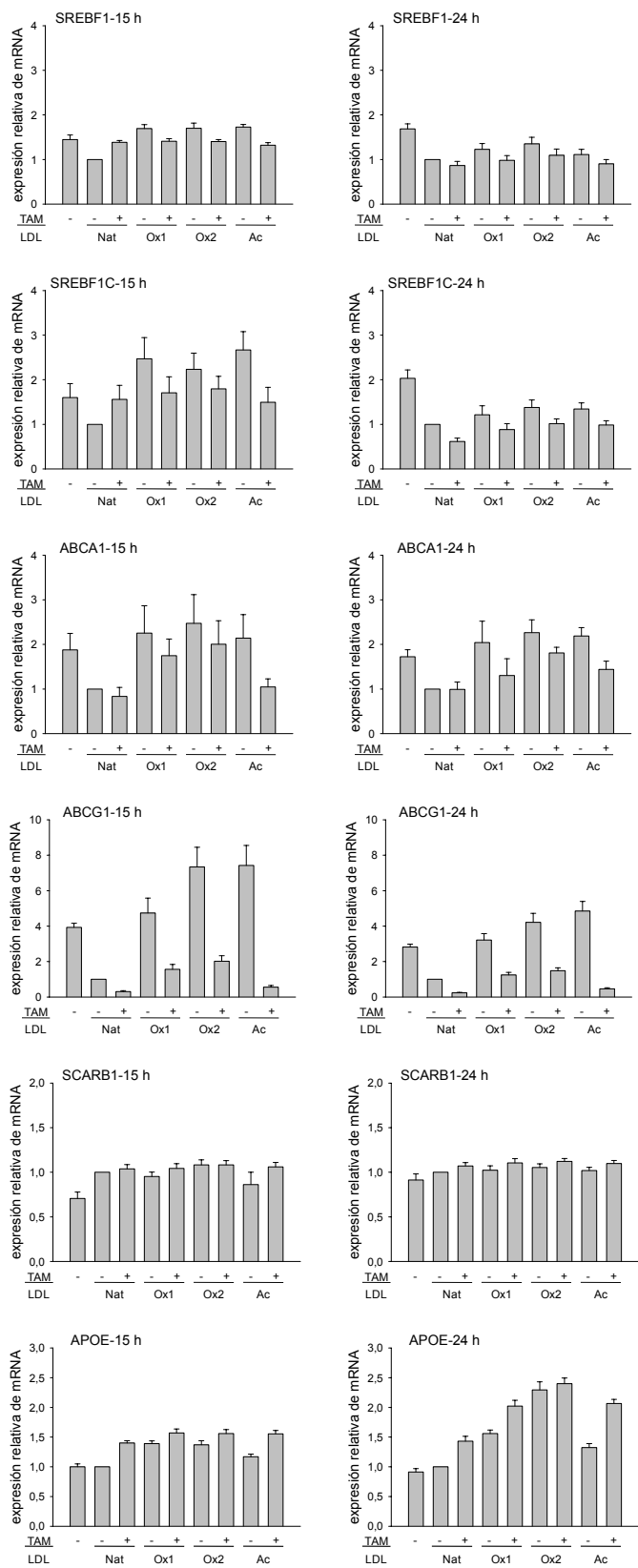


Figura 24. Efecto del TAM en presencia de distintos tipos de LDL sobre la expresión de genes diana de LXR y la expresión de SCARB1 en macrófagos THP-1. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la condición con LDL nativas (Nat) solas, a la que se dio valor uno, tras normalizar por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm

3. Efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol de los macrófagos

Una de las principales funciones de las HDL es la de actuar como aceptores del colesterol celular para su transporte al hígado y excreción en heces, a lo que se denomina transporte reverso de colesterol (apartado 4.2 de la Introducción). Los macrófagos tienen la capacidad de captar activamente lipoproteínas modificadas y, tras esterificarlo, acumular su colesterol. De este pueden deshacerse, previa hidrólisis de los ésteres de colesterol, mediante su exportación hacia aceptores extracelulares como las HDL. Este proceso es especialmente importante en la íntima arterial, donde los macrófagos pueden acumularse y convertirse en células espumosas. Si su capacidad para exportar o acumular el colesterol en forma esterificada se ve sobrepasada, los macrófagos pueden sufrir apoptosis y necrosis, y contribuir al reclutamiento de otras células y al desarrollo de procesos inflamatorios que favorecen la aterosclerosis y los accidentes cardiovasculares [317, 319]. Dado que, como hemos expuesto, los SERM modifican el tráfico intracelular del colesterol exógeno y la respuesta a éste en distintas líneas celulares, incluyendo macrófagos THP-1, nos preguntamos si aquéllos fármacos tendrían también efectos sobre la exportación de colesterol desde los macrófagos.

3.1. Estudios en macrófagos THP-1

La línea celular humana THP-1 proviene de una leucemia monocítica aguda. Estas células son ampliamente utilizadas en investigación tanto en forma de monocitos como de macrófagos tras diferenciarlas. Para estudiar los efectos de los SERM sobre los macrófagos comenzamos con esta línea celular. El diseño experimental utilizado, salvo aclaración, fue el siguiente: Los macrófagos THP-1 se mantuvieron en medio RPMI con LPDS al 10 % durante 24 h. Luego añadimos cada uno de los SERM a una concentración de 10 μ M o vehículo y 120 μ g de colesterol/ml en forma de LDL-Ac para promover la acumulación celular de colesterol. Pasadas 24 h desde la adición de los SERM analizamos los efectos de los tratamientos sobre distintos aspectos de la fisiología celular.

3.1.1. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el contenido y la síntesis de colesterol

Siguiendo el diseño anterior y una vez terminados los tratamientos, se recogieron las células y se lisaron para la evaluación del contenido celular de colesterol. Además de estudiar el efecto de los SERM, determinamos, como referencia, el contenido de colesterol antes de diferenciar las células y, por otro lado, antes de añadir LDL-Ac a los macrófagos. Como puede apreciarse en la figura (**Fig. 25A**), el contenido de colesterol fue similar en los monocitos y en los macrófagos no tratados con LDL-Ac. La adición de LDL-Ac a los macrófagos aumentó notablemente la cantidad de colesterol celular, pero ésta no varió por el tratamiento con ninguno de los SERM (**Fig. 25A**).

Para estudiar el efecto de los SERM sobre la síntesis de colesterol se añadieron, con intervalos de 1 h, SERM, LDL-Ac y [14 C]acetato, por este orden, al medio de cultivo. Transcurridas 10 h desde la adición de los SERM, las células se lisaron y se analizó el perfil de esteroides

radiactivos. La diferenciación de los monocitos a macrófagos disminuyó drásticamente la síntesis de colesterol (**Fig. 25B**). La síntesis de colesterol en los macrófagos apenas se redujo con la adición de LDL-Ac respecto a la condición en LPDS. La adición de TAM, RAL o TOR disminuyó la síntesis de colesterol en una magnitud similar respecto a la situación control con LDL-Ac (**Fig. 25B**).

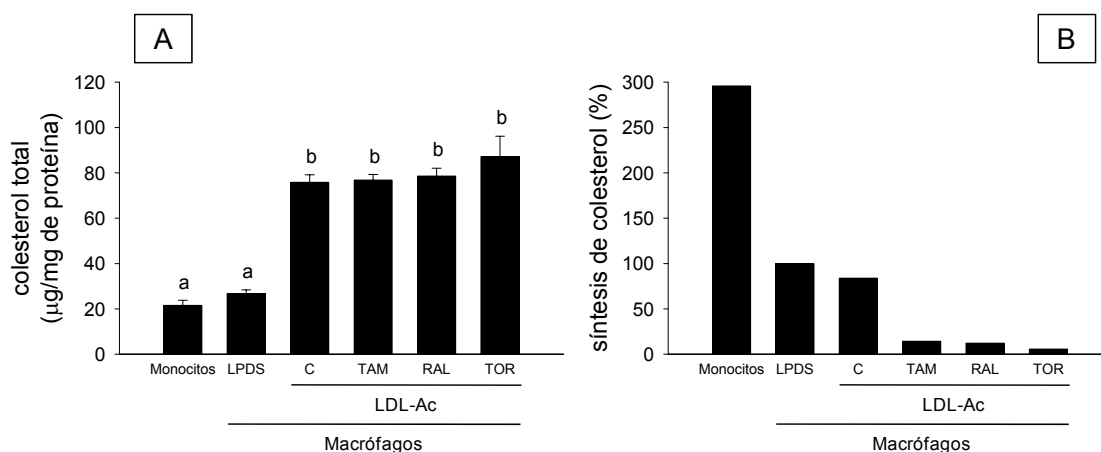


Figura 25. Efecto de los SERM y las LDL-Ac sobre el contenido (A) y la síntesis (B) de colesterol en macrófagos THP-1. A: se representan las medias \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para medidas repetidas, y post hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; entre las barras con distinta letra existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). B: las cpm/mg de proteína se normalizaron tomando las correspondientes a la condición LPDS como el 100 %. Se representa un experimento representativo de dos.

3.1.2. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular de colesterol

Para estudiar los efectos de los SERM sobre la distribución intracelular de colesterol, los macrófagos THP-1 se trataron con cada uno de los SERM o vehículo en presencia de LDL-Ac como se ha indicado anteriormente, tras lo cual se fijaron y se tiñeron con filipina.

La adición de TAM, RAL o TOR a los macrófagos produjo en todos los casos la formación de acúmulos citoplasmáticos de colesterol libre en forma de múltiples vesículas y con una apariencia claramente distinta a la observada en los macrófagos no tratados con ningún SERM, cuya tinción tenía una apariencia más reticular (**Fig. 26**). Dichos acúmulos vesiculares, como hemos mencionado anteriormente, son característicos de una deficiencia en la salida de colesterol de ET/L, tal y como sucede en la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C [131].

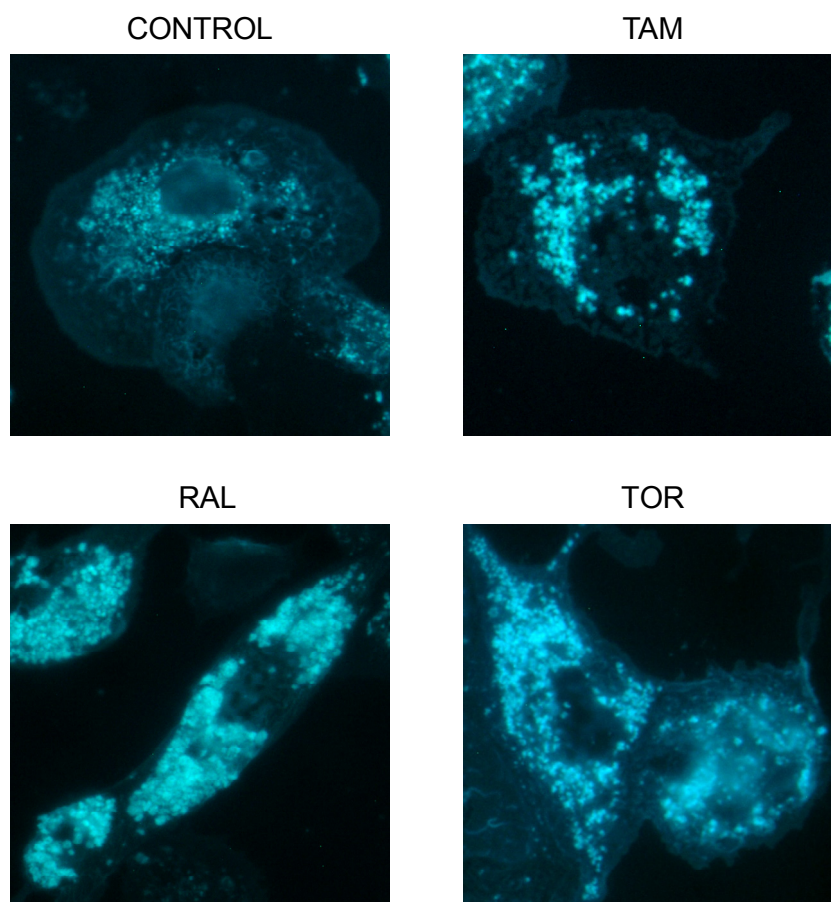


Figura 26. Efecto de los SERM sobre la distribución intracelular de colesterol en macrófagos THP-1. Las células se tiñeron con filipina y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

3.1.3. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión de moléculas transportadoras de colesterol

El tráfico intracelular de colesterol resulta crítico para la generación de oxiesteroides que activan el factor de transcripción LXR, induciendo de esa forma la expresión de transportadores clave en la exportación del colesterol celular, como ABCA1 y ABCG1. Dado que los tres SERM causaban una distorsión en el tráfico intracelular del colesterol lipoproteico, evaluamos el efecto de los mismos sobre la expresión de varias moléculas implicadas en el transporte del colesterol celular, para lo cual comenzamos estudiando el efecto de diferentes dosis de TAM. Las células THP-1 se incubaron con TAM 2,5, 5 y 10 μM o vehículo en presencia de LDL-Ac. Se usó también el tratamiento con el activador de LXR T0901317 (T0), a concentración 1 μM , como control positivo de la expresión de los genes diana de LXR, y una condición con vehículo solo como control negativo. En primer lugar, se analizó la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

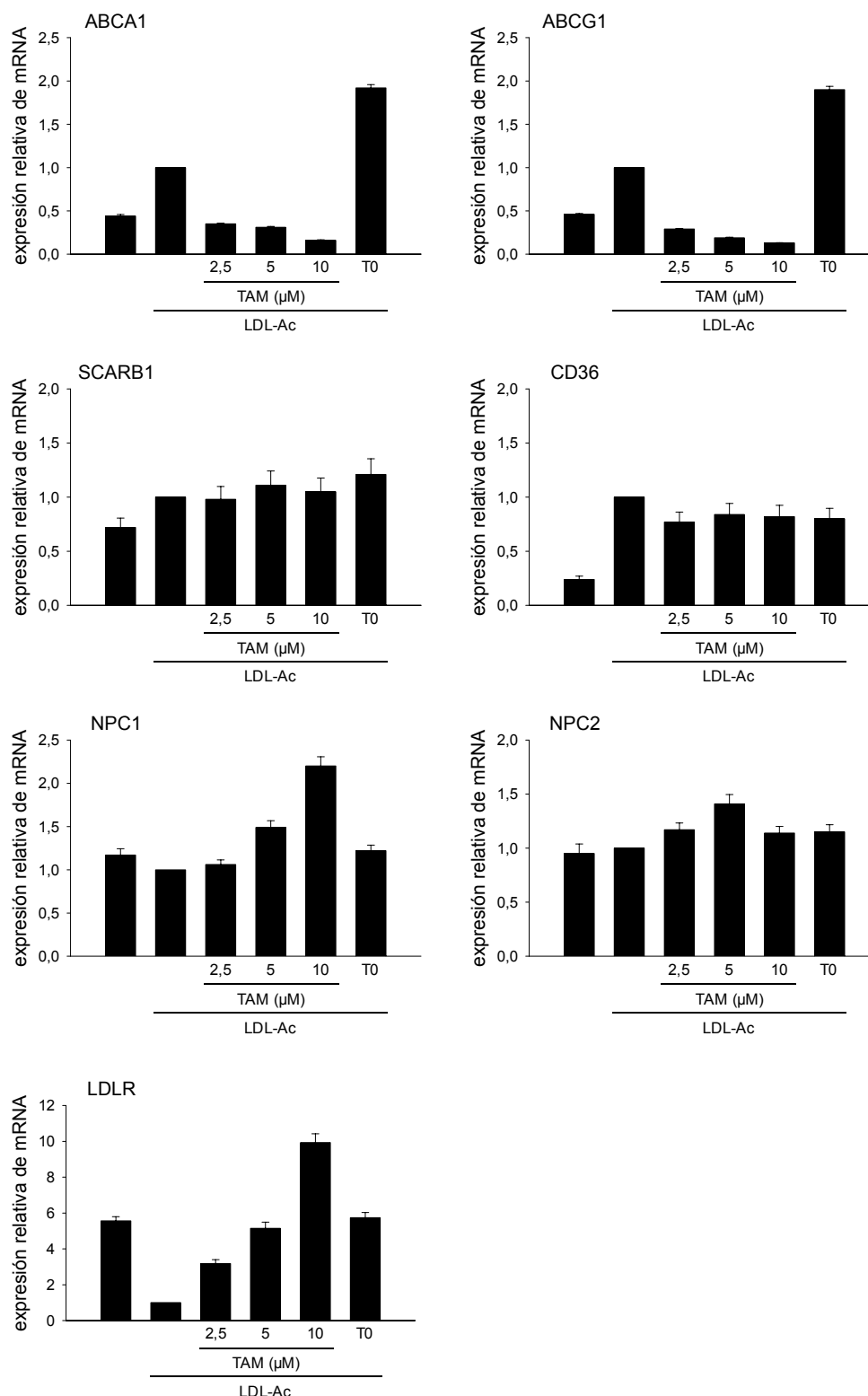


Figura 27. Efecto del TAM sobre la expresión de genes de moléculas transportadoras de colesterol en macrófagos THP-1. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes respecto a la condición con LDL-Ac solas, a la que se dio valor uno, tras normalizar por la expresión del control invariable RPLP0. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de tres medidas de un experimento representativo de dos.

RESULTADOS

Como cabía esperar, la adición de LDL-Ac aumentó la expresión de los genes diana de LXR ABCA1 y ABCG1 respecto a la condición sin LDL-Ac, efecto que se vio potenciado en presencia de T0 (**Fig. 27**). La adición de TAM disminuyó la expresión de los genes ABCA1 y ABCG1 de manera dependiente de la dosis, llegando a grados de expresión incluso más bajos que en ausencia de LDL-Ac. La expresión de SCARB1, gen que no responde a la activación de LXR en estas células, aumentó ligeramente con la adición de LDL-Ac, aunque apenas se modificó por efecto del TAM o T0 (**Fig. 27**). Aunque la cantidad de mRNA del receptor *scavenger* CD36 aumentó por efecto de las LDL-Ac, el TAM tampoco cambió significativamente su expresión. Este fármaco apenas alteró la expresión génica del transportador lisosomal NPC2, mientras que la de NPC1, también lisosomal, sí aumentó con la dosis del mismo (**Fig. 27**). Por otro lado, el TAM estimuló notablemente la expresión de LDLR de manera creciente con la concentración, permitiendo a los macrófagos superar la represión inducida por las LDL-Ac (**Fig. 27**).

A continuación, analizamos el efecto de las distintas dosis de TAM sobre la expresión de las proteínas exportadoras de colesterol. Los efectos de este fármaco sobre la expresión de las proteínas ABCA1 y ABCG1 fueron similares a los observados sobre las expresiones génicas correspondientes. Así, el TAM disminuyó intensamente la cantidad de proteínas ABCA1 y ABCG1 de manera dependiente de la dosis (**Fig. 28A**). Por otro lado, el RAL y el TOR a dosis 10 μM fueron también capaces de disminuir claramente la cantidad de dichas moléculas (**Fig. 28B**). El patrón de respuesta de SR-BI fue, una vez más, diferente al de las dianas paradigmáticas de LXR, si bien a la dosis de 10 μM los tres SERM aumentaron en cierta medida la expresión de aquel receptor (**Fig. 28B**). En presencia del activador de LXR, los distintos SERM apenas se opusieron, o solo levemente, a la marcada estimulación de la expresión de ABCA1 y ABCG1 (**Fig. 28B**). En conjunto, los resultados indican que el tratamiento de macrófagos THP-1 con cualquiera de los tres SERM inhibe la inducción de la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1, dianas de LXR, por las LDL-Ac, efecto asociado a la acumulación lisosomal del colesterol de estas partículas.

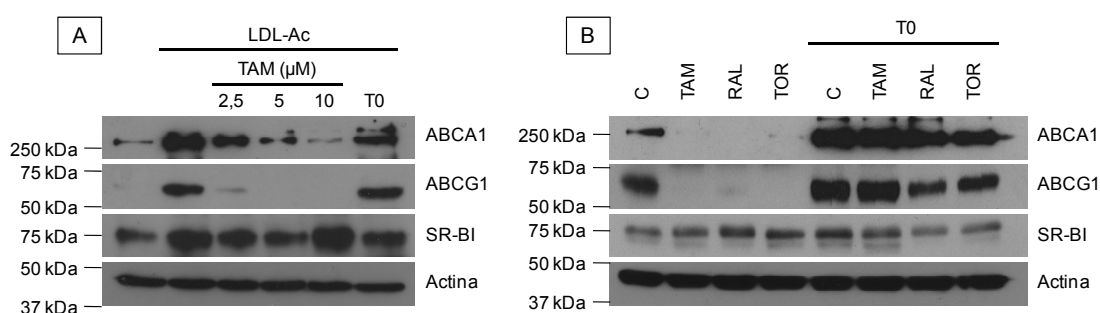


Figura 28. Efecto de los SERM sobre la expresión de moléculas exportadoras de colesterol en macrófagos THP-1 mediante *western blot*. A: tratamiento con varias dosis de TAM, T0 1 μM y LDL-Ac según se indica. B: tratamiento con los SERM 10 μM combinados o no con T0 1 μM y en presencia de LDL-Ac. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

3.1.4. Efecto del TAM sobre la exportación del colesterol celular

El hecho de que los SERM interfieran en el tráfico intracelular de colesterol impidiendo su salida del ET/L y que disminuyan la expresión de ABCA1 y ABCG1 sugiere que la exportación del colesterol celular hacia aceptores extracelulares se encuentre alterada. Para conocer, en primer lugar, cómo afecta el TAM a dicha exportación los macrófagos THP-1 se marcaron con [3 H]colesterol disuelto en etanol, procedimiento que marca principalmente la membrana celular. Tras retirar la radiactividad no incorporada, las células se trataron con TAM 5 o 10 μ M o vehículo, en presencia de LDL-Ac, durante 24 h. A continuación, retiramos el medio e incubamos las células durante 4, 8 o 24 h en medio RPMI con BSA al 0,2 % en ausencia o presencia de HDL (50 μ g de apo A-I/ml) o apo A-I (50 μ g/ml) como aceptores del colesterol celular exportado por ABCG1 y SR-BI en el primer caso y por ABCA1 en el segundo.

Como se muestra en la **Fig. 29**, la cantidad de colesterol exportado hacia ambos aceptores aumentó con el tiempo, aunque la velocidad de exportación disminuyó progresivamente. En las células que habían sido tratadas con TAM disminuyó la exportación de [3 H]colesterol hacia la apo A-I de manera dependiente de la dosis tanto a las 4 como a las 8 h, aunque la dosis 5 μ M no llegó a ser estadísticamente significativa a las 8 h (**Fig. 29A**). A las 24 h, la reducción de la exportación con el TAM prácticamente había desaparecido, lo que indica la reversibilidad de dicho efecto. Por otro lado, la exportación de [3 H]colesterol hacia las HDL fue mayor que hacia la apo A-I en todos los tiempos (**Fig. 29B**). El tratamiento previo con TAM también disminuyó la exportación de [3 H]colesterol hacia estas partículas, aunque las diferencias no fueron tan notables como en el caso de la apo A-I. A las 24 h, la exportación de colesterol desde las células tratadas con el SERM hacia las HDL se había restablecido completamente (**Fig. 29B**).

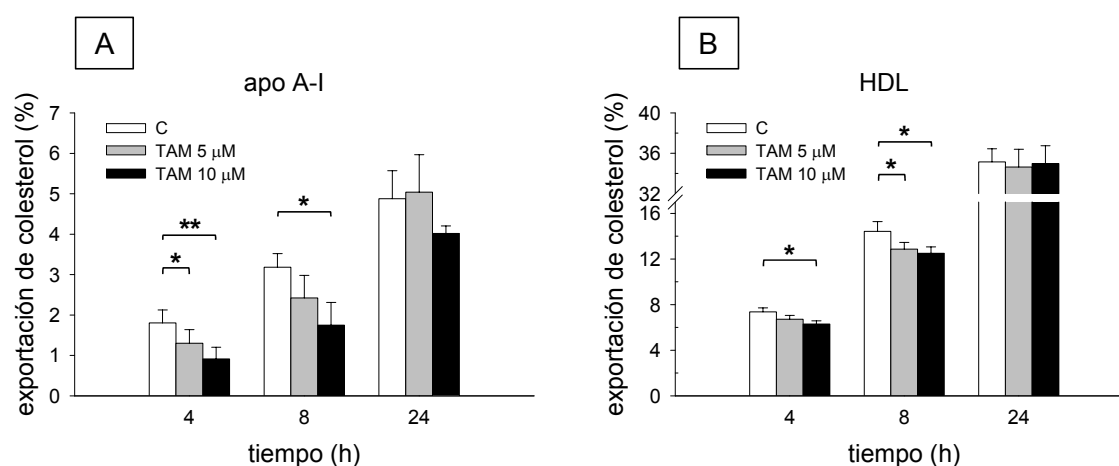


Figura 29. Efecto de distintas dosis de TAM sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I y HDL a varios tiempos en macrófagos THP-1 marcados con [3 H]colesterol en etanol. Se representan las medias \pm error estándar de seis experimentos independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para medidas repetidas para cada tiempo, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.5. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la exportación celular del colesterol de la vía endosomal

Cuando las células se marcan con [3 H]colesterol disuelto en etanol, el mismo puede distribuirse por toda la célula, pero la mayor parte se localiza en la MP, por lo que su cesión a los aceptores extracelulares no depende de su procesamiento en la vía endosomal. Nuestros resultados previos en los que observamos un defecto en el tráfico intracelular de colesterol nos llevaron a preguntarnos en qué medida los SERM afectaban la exportación del colesterol lipoproteico que el macrófago capta y procesa por la vía endosomal. Para responder a esta pregunta, las LDL-Ac añadidas al medio durante el tratamiento de los macrófagos THP-1 con los SERM estaban marcadas con [3 H]colesterol. Tras los tratamientos, se analizó la cesión del [3 H]colesterol a apo A-I y HDL durante 4 y 8 h como anteriormente.

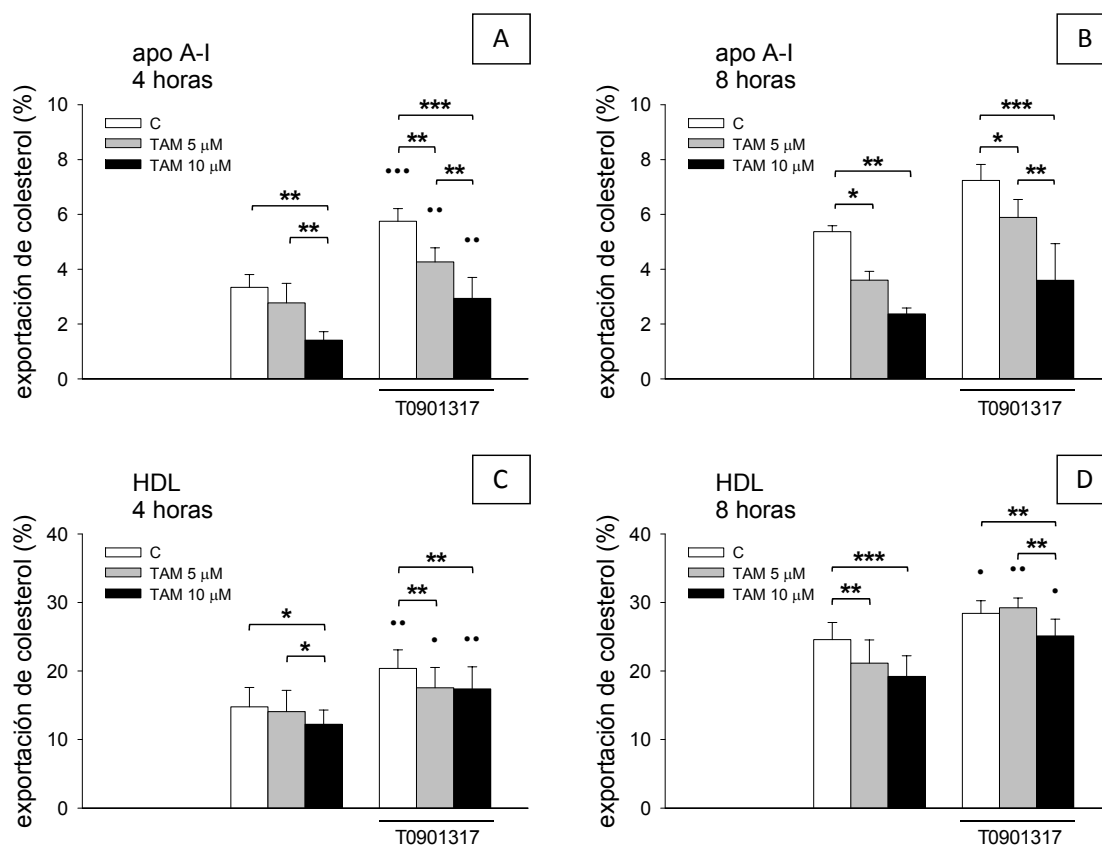


Figura 30. Efecto de distintas dosis de TAM y T0 sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I y HDL a 4 y 8 h en macrófagos THP-1 marcados LDL-Ac-[3 H]colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de tres y cuatro experimentos independientes para las 4 y 8 h respectivamente. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; */• $p < 0,05$, **/•• $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Los asteriscos se refieren al efecto del TAM y los puntos al del T0 para la misma concentración de TAM.

En primer lugar, analizamos el efecto de distintas dosis de TAM y distintos tiempos de exposición a apo A-I y HDL. La exportación de colesterol hacia apo A-I disminuyó de manera dependiente de la dosis de TAM tanto a las 4 (**Fig. 30A**) como a las 8 h (**Fig. 30B**) de incubación. Con este diseño, la cesión de [3 H]colesterol a las HDL también fue más eficiente que a la apo A-I. El TAM también disminuyó la exportación de colesterol hacia las HDL, aunque el efecto fue nuevamente menos pronunciado que con apo A-I (**Fig. 30C y D**). Estos resultados son coherentes con la acumulación del colesterol derivado de las LDL-Ac en los endosomas tardíos/lisosomas causada por el TAM, pero nos interesó discernir hasta qué punto eran el resultado de esta distorsión del tráfico intracelular per sé o, por otra parte, de la inhibición de la expresión de ABCA1 y ABCG1 inducida por el fármaco. Así pues, estudiamos el efecto de la adición simultánea de T0 para estimular la expresión de ABCA1 y ABCG1 mediante la activación de LXR (ver **Fig. 28**). Como se muestra en la **Fig. 30**, la adición de T0 aumentó la exportación de colesterol con ambos aceptores, pero no fue capaz de suprimir el efecto inhibitorio del TAM. Por lo tanto, aunque el aumento de la expresión de los transportadores logre estimular la exportación del colesterol lipoproteico, esta no se restablece, lo que indica que la interrupción del tráfico intracelular de ese colesterol juega un importante papel en la inhibición de su exportación por el TAM.

Para comprobar si los efectos inhibitorios del TAM sobre la exportación de colesterol se reproducían con RAL y TOR escogimos el tiempo de 8 h y la dosis de 10 μ M como condiciones de trabajo. Las células fueron tratadas con cada uno de los SERM o vehículo en combinación o no con T0 y en presencia de LDL-Ac-[3 H]colesterol como se ha descrito anteriormente. Los tres SERM disminuyeron significativamente la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I (**Fig. 31A**). El más potente fue el TAM y el menos potente el TOR, entre los cuales la diferencia fue estadísticamente significativa. El T0 aumentó significativamente la exportación de [3 H]colesterol solo en la condición con TAM. En presencia de T0, los SERM disminuyeron la exportación de [3 H]colesterol, aunque las diferencias disminuyeron, de manera que el único que se mantuvo estadísticamente diferente de la condición control (solo T0) fue el RAL (**Fig. 31A**).

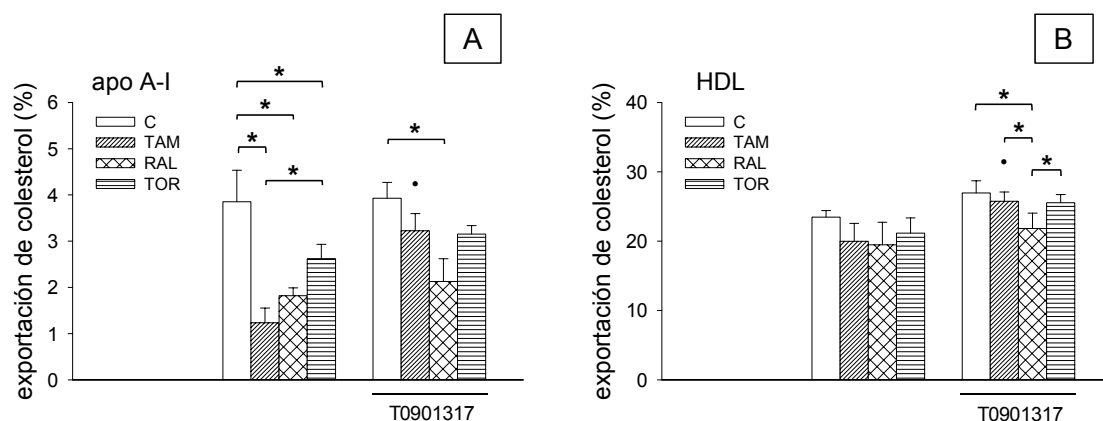


Figura 31. Efecto de los SERM y T0 sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I (A) y HDL (B) a 8 h en macrófagos THP-1 marcados con LDL-Ac-[3 H]colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * y •, $p < 0,05$. Los asteriscos se refieren al efecto de los SERM y los puntos al del T0 para el mismo SERM.

RESULTADOS

Respecto a la presencia de HDL (**Fig. 31B**), aunque se observó una tendencia a la disminución de la salida de [3 H]colesterol por efecto de los SERM, ninguno de ellos llegó a alcanzar en este caso una diferencia estadísticamente significativa respecto al control, aunque el TAM ($p = 0,073$) y el RAL ($p = 0,067$) estuvieron próximos a ello. En presencia de T0, éste solo aumentó significativamente la exportación en presencia de TAM. Nuevamente, los tres SERM inhibieron ligeramente la cesión de [3 H]colesterol hacia las HDL, pero el efecto solo fue significativo para el RAL, que redujo la exportación respecto al resto de condiciones con T0. En esencia, estos resultados muestran que los tres SERM son capaces de inhibir la exportación de [3 H]colesterol por los macrófagos THP-1, si bien este efecto es más acusado cuando el aceptor es la apo A-I.

Cuando los macrófagos THP-1 se trataron con los SERM en presencia de LDL-[3 H]colesterol en lugar de LDL-Ac marcadas los efectos de dichos fármacos sobre la exportación de [3 H]colesterol fueron, en términos generales, similares a los obtenidos con LDL-Ac-[3 H]colesterol (**Fig. 32**).

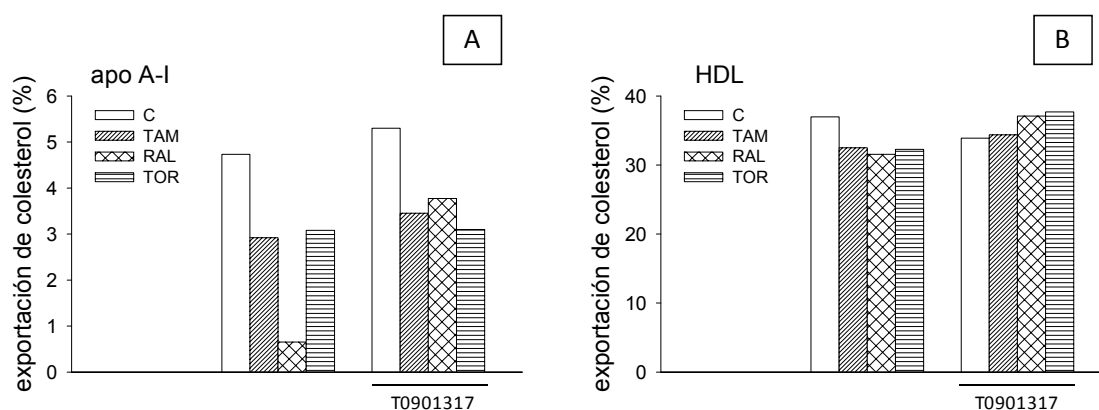


Figura 32. Efecto de los SERM y T0 sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I y HDL a 8 h en macrófagos THP-1 marcados con LDL-[3 H]colesterol. Se representan las medias de dos réplicas de un experimento representativo de dos.

Dado que con este diseño experimental el tratamiento con los SERM es simultáneo a la incorporación celular de las LDL marcadas, quisimos comprobar si esta se veía alterada por los SERM. Ninguno de los SERM afectaba la captación de LDL-Ac-[3 H]colesterol por los macrófagos (**Fig. 33A**). Por otro lado, observamos que los SERM no afectaban la salida del [3 H]colesterol al medio cuando este no contenía un aceptor específico (**Fig. 33B**). Así pues, la inhibición de la exportación de colesterol por los SERM solo afecta a los mecanismos específicos.

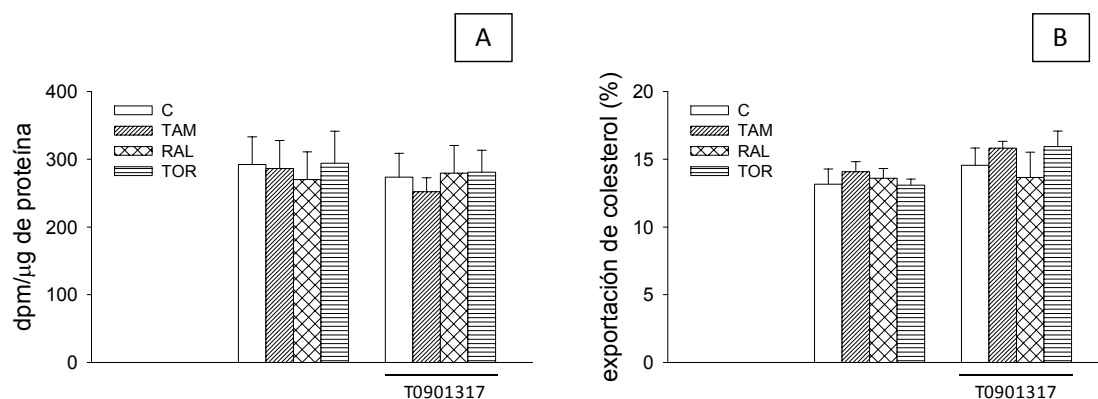


Figura 33. Efecto de los SERM y T0 sobre la captación de LDL-Ac-[³H]colesterol (A) y la exportación de [³H]colesterol hacia el medio sin aceptor específico (B) a 8 h en macrófagos THP-1 marcados con LDL-Ac-[³H]colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas.

Los SERM deben su nombre a la capacidad que tienen para modular los ER. Nos propusimos, por tanto, conocer si los efectos observados sobre la exportación de colesterol estaban mediados por dichos receptores, por lo que estudiamos el efecto del E2, su ligando natural, y, por otro lado, de la adición del inhibidor de los ER ICI. Para ello, los ensayos se realizaron con un diseño similar al anterior pero utilizando medio RPMI 1640 sin rojo fenol y suero que había sido tratado con carbón activado para retirar los estrógenos. Las células se incubaron con E2 a dos concentraciones distintas, 25 y 250 nM, o SERM 10 μ M, todos ellos combinados o no con el inhibidor ICI a una concentración de 1 μ M.

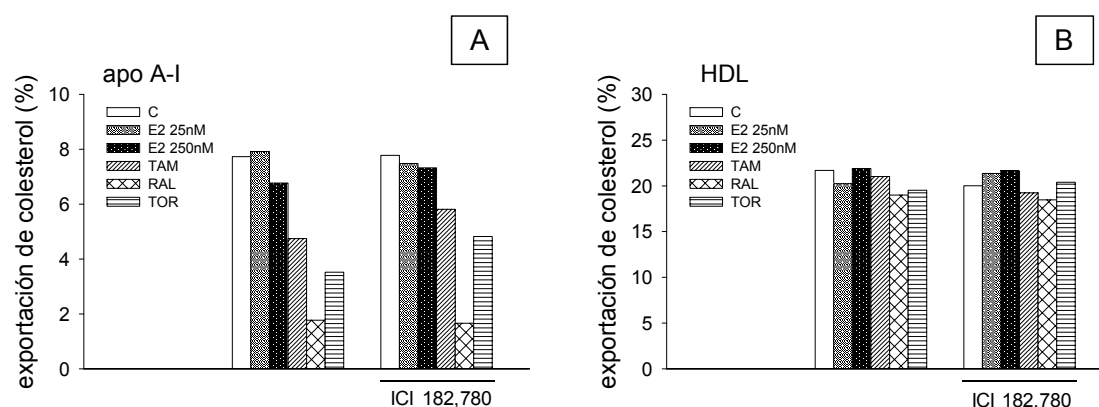


Figura 34. Efecto del E2 y los SERM en combinación o no con ICI 182,170 sobre la exportación de [³H]colesterol hacia apo A-I y HDL a 8 h por macrófagos THP-1 marcados con LDL-Ac-[³H]colesterol. Se representan las medias de dos réplicas de un experimento representativo de dos.

RESULTADOS

Como anteriormente, los SERM disminuyeron notablemente la exportación de [3 H]colesterol hacia la apo A-I (**Fig. 34A**) y ligeramente hacia las HDL (**Fig. 34B**). Comparativamente con estos fármacos, la adición de cada una de las dos dosis de E2 apenas tuvo efecto sobre la exportación de [3 H]colesterol ni hacia apo A-I (**Fig. 34A**) ni hacia HDL (**Fig. 34B**). El inhibidor de los ER no modificó la respuesta a ninguno de los anteriores agentes. Todo lo anterior indica que el mecanismo por el cual los SERM disminuyen la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I y HDL es independiente de los ER.

Nuestros estudios previos habían mostrado que los SERM tenían un efecto estimulador sinérgico sobre dianas de SREBP cuando se combinaban con LOV. Nos planteamos si no existiría igualmente un efecto sinérgico, en este caso represor, sobre la exportación del colesterol celular. Para ello utilizando el método antes descrito tratamos los macrófagos con cada uno de los SERM 10 μ M combinado o no con LOV 1 μ M. Como se puede observar en la **Fig. 35A**, la combinación con LOV no acentuó apreciablemente la inhibición de la exportación del colesterol hacia apo A-I producida por los SERM. Lo mismo ocurrió cuando se evaluó la exportación hacia las HDL (**Fig. 35B**).

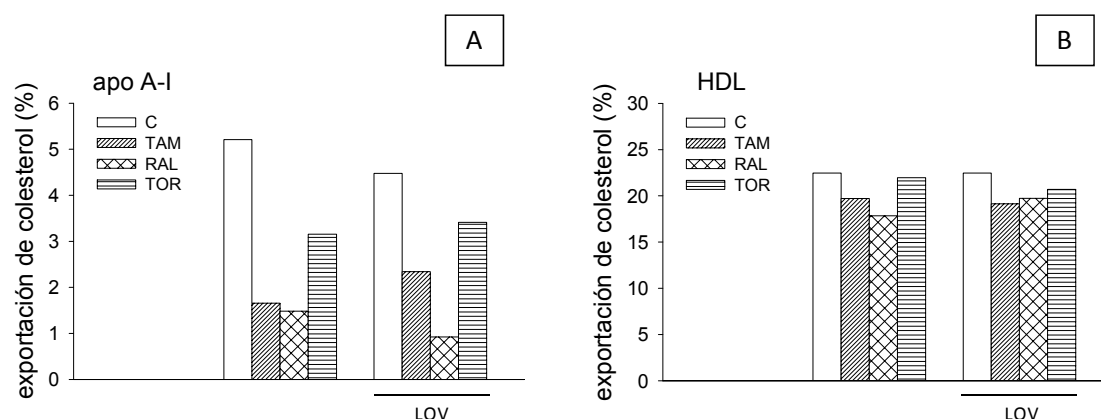


Figura 35. Efecto de los SERM y su combinación con LOV sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I y HDL a 8 h en macrófagos THP-1 marcados con LDL-Ac-[3 H]colesterol. Se representan las medias de dos réplicas de un experimento representativo de dos.

En conjunto, los resultados de este apartado indican que los tres SERM inhiben la exportación del colesterol del macrófago, especialmente hacia la apo A-I, efecto que es independiente de los ER y que no es sinérgico con el efecto de la LOV.

3.2. Estudios en macrófagos primarios humanos

Aunque los resultados de los estudios con los SERM en los macrófagos THP-1 son claros, estas células, al tener un origen tumoral podrían responder a los SERM de manera diferente a los macrófagos primarios. Es por ello que decidimos comprobar los efectos de los SERM en MPH, para lo cual se aislaron monocitos de sangre periférica de hombres sanos y se diferenciaron a macrófagos durante siete días.

3.2.1. *Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular de colesterol*

Como en el caso de los macrófagos THP-1, los macrófagos primarios se mantuvieron en medio RPMI 1640 con LPDS al 10 % durante 24 h y a continuación se les añadieron cada uno de los SERM a una concentración de 10 μ M o vehículo, y 120 μ g de colesterol/ml en forma de LDL-Ac. Transcurridas 24 h desde la adición de los SERM las células se fijaron y se tiñeron con filipina para analizar la distribución del colesterol libre y también con Bodipy para analizar la de lípidos neutros.

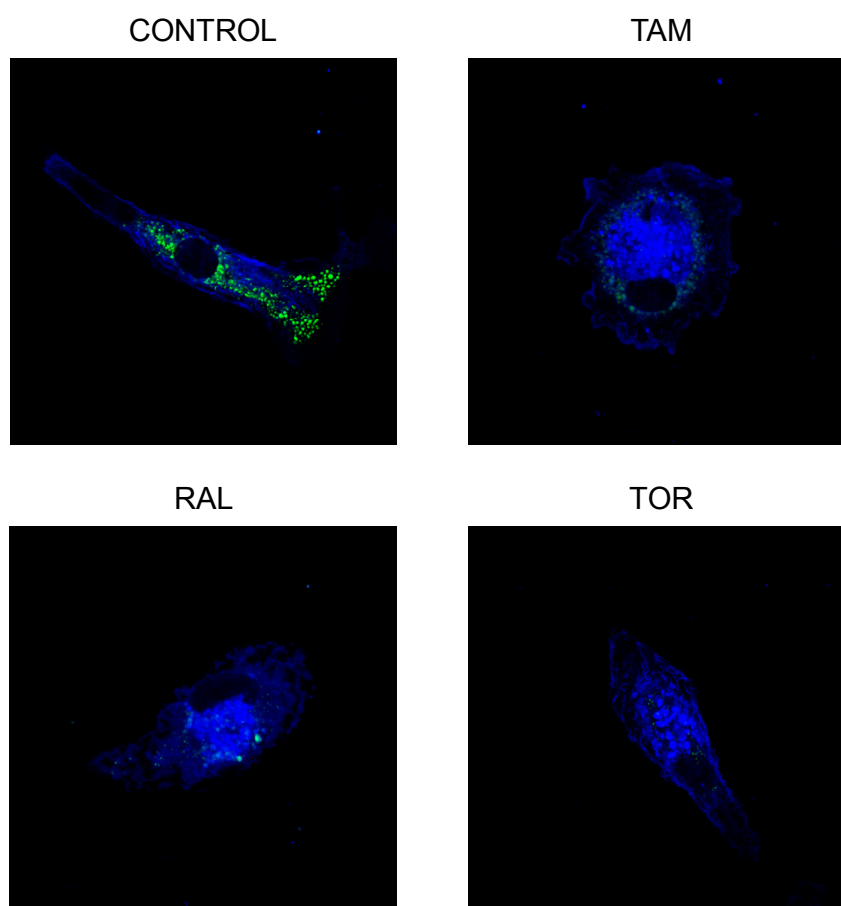


Figura 36. Efecto de los SERM sobre la distribución de colesterol libre y esterificado en macrófagos primarios humanos. Las células se tiñeron con filipina y Bodipy y se observaron mediante microscopía confocal. Los resultados corresponden a los macrófagos de un donante representativo de tres donantes distintos.

Al igual que ocurría en las células THP-1, el tratamiento con TAM, RAL y TOR produjo la formación de acúmulos citoplasmáticos de colesterol libre (en azul) que no se observaban en la condición control, donde la tinción con filipina tenía un aspecto más difuminado (**Fig. 36**). Otra clara diferencia fue que en el control aparecían gránulos citoplasmáticos de lípidos neutros (en

verde) que, dado el tratamiento con LDL-Ac, corresponderían principalmente a ésteres de colesterol, y que prácticamente desaparecían en las condiciones con SERM. Esto último es compatible con una menor disponibilidad del colesterol de los lisosomas para su esterificación en el retículo endoplásmico.

3.2.2. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión de moléculas transportadoras de colesterol

A continuación quisimos evaluar el efecto de los SERM sobre la expresión de distintos transportadores de colesterol, implicados tanto en la importación o exportación celulares como en el tráfico intracelular de colesterol. Seguimos el diseño experimental anterior, utilizando, además, T0 1 μ M para activar LXR. Se midió la expresión de proteína por *western blot*.

Los SERM disminuyeron la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1 (**Fig. 37**). La presencia de T0 incrementó la expresión de estos transportadores, dianas de LXR, y prácticamente abolió la disminución producida por los SERM. En estas células la expresión del receptor *scavenger* SR-BI aumentó por efecto de cada uno de los SERM, hecho que no modificó la adición de T0. Por otra parte, el tratamiento con SERM o T0 no modificó la expresión del receptor *scavenger* CD36 ni la de NPC1, proteína lisosomal implicada en el transporte del colesterol libre desde el lisosoma al citoplasma. Por lo tanto, también en los MPH los tres SERM reducen la expresión de ABCA1 y ABCG1 en asociación con una interferencia en el tráfico endosomal/lisosomal de colesterol.

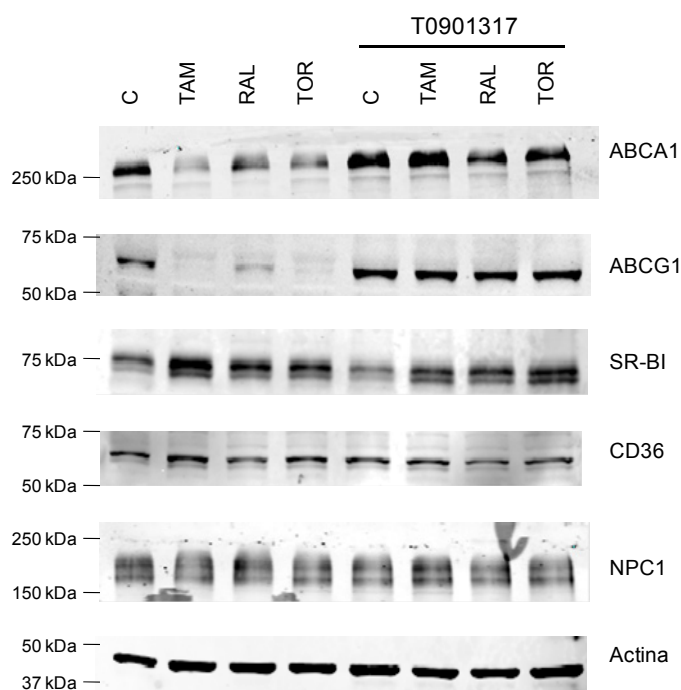


Figura 37. Efecto de los SERM y T0 sobre la expresión de moléculas implicadas en el transporte de colesterol en macrófagos primarios humanos mediante *western blot*. Los resultados corresponden a los macrófagos de un donante representativo de tres donantes distintos.

3.2.3. Efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol de la vía endosomal

Dado que las acciones de los SERM sobre el tráfico intracelular de colesterol y la expresión de ABCA1 y ABCG1 que habíamos observado en macrófagos THP-1 se reproducían en macrófagos primarios, quisimos comprobar sus efectos sobre la exportación de colesterol por estas células. Para ello, los macrófagos de distintos donantes se marcaron con LDL-Ac- ^3H colesterol siguiendo el mismo diseño experimental que para las células THP-1 y se midió la exportación de colesterol tras incubarlos sin aceptor específico (medio con 0,2 % de albúmina de suero humano [HSA]), con apo A-I (50 $\mu\text{g/ml}$) o con HDL (50 μg de apo A-I/ml). En un estudio preliminar, determinamos la exportación de ^3H colesterol a distintos tiempos por los macrófagos primarios no tratados con SERM. Como se puede observar en la **Fig. 38A**, la exportación de ^3H colesterol hacia las HDL fue la más activa, siendo la exportación neta (tras restar la exportación al medio), en promedio, un 14,3 % a las 8 h y un 26,2 % a las 24 h. Sin embargo, en presencia de apo A-I la cantidad de ^3H en el medio no se distinguió de la propia de la condición sin aceptor específico, incluso prolongando el tiempo de exportación hasta las 24 h, por lo que la exportación neta era nula. Esto limitaba la evaluación de los posibles efectos de los SERM sobre la exportación hacia la apo A-I.

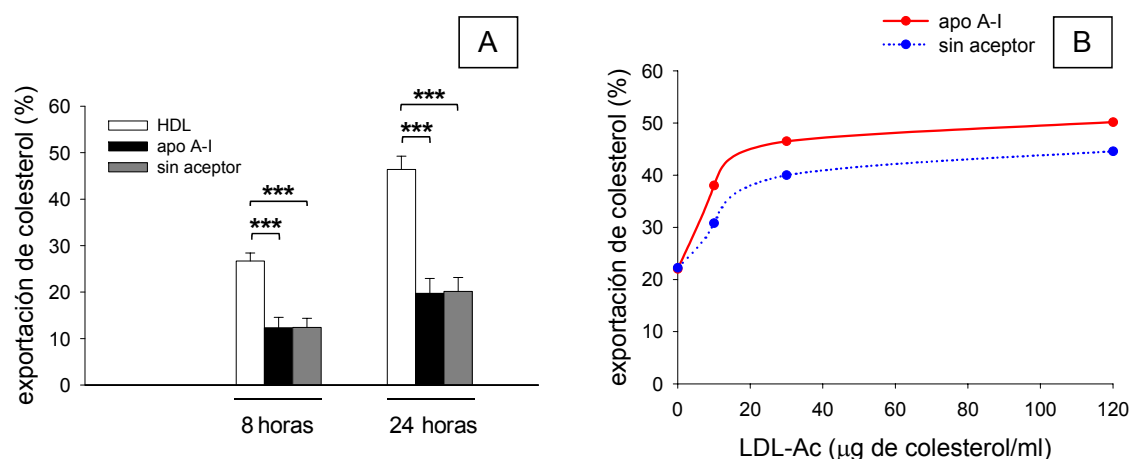


Figura 38. Efecto de diferentes tiempos de exportación de ^3H colesterol hacia HDL, apo A-I o medio sin aceptor (A). Se representan las medias \pm error estándar de ocho (8 h) ó cinco (24 h) preparaciones de macrófagos primarios humanos de distintos donantes marcados con LDL-Ac- ^3H colesterol. Los resultados se analizaron estadísticamente para cada tiempo con el test ANOVA de una vía para medidas repetidas, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; *** $p < 0,001$. B: Efecto de la adición de diferentes dosis de LDL-Ac durante la exportación de ^3H colesterol hacia apo A-I o medio sin aceptor específico durante 24 h. Los resultados corresponden a la media de dos preparaciones de macrófagos de distintos donantes.

Otros autores [384, 385] han descrito que las LDL pueden actuar como reservorio del colesterol celular cedido en primera instancia a los aceptores específicos, como son la apo A-I y

RESULTADOS

las HDL, lo que favorecería un gradiente de colesterol entre la membrana celular y estos aceptores. Basándonos en este hallazgo decidimos realizar nuestro estudio añadiendo LDL-Ac a los medios conjuntamente con los anteriores aceptores. Para decidir la dosis adecuada de LDL-Ac para nuestras condiciones, realizamos los ensayos de exportación de [3 H]colesterol durante 24 h con distintas dosis de LDL-Ac en presencia o ausencia de apo A-I (**Fig. 38B**). En ausencia de apo A-I, las LDL-Ac estimularon activamente la salida de [3 H]colesterol al medio, proceso que alcanzó un máximo a partir de 30 μ g de colesterol de LDL-Ac/ml. Tal y como había ocurrido en los experimentos anteriores, sin LDL-Ac en el medio la apo A-I no estimuló la exportación de [3 H]colesterol respecto a la condición sin aceptor específico (**Fig. 38B**). Sin embargo, al añadir 10 μ g de de LDL-Ac colesterol/ml la exportación de [3 H]colesterol en presencia de apo A-I aumentó por encima de la inducida por las LDL-Ac, y la diferencia se mantuvo a concentraciones superiores de estas lipoproteínas.

Teniendo en cuenta los anteriores datos, escogimos la dosis de LDL-Ac correspondiente a 10 μ g de colesterol/ml para estudiar el efecto de los SERM sobre la exportación de [3 H]colesterol por los macrófagos primarios, de manera que se incluyó dicha concentración de LDL-Ac en el medio durante la fase de exportación, restándose la exportación registrada en este medio (ver más abajo) de la producida al adicionar apo A-I o HDL. Por otro lado, dado que la exportación neta de colesterol en presencia de los aceptores específicos era menor en los macrófagos primarios que en los THP-1 (compárese la **Fig. 38A** con las **Fig. 30 y 32**), prolongamos la fase de exportación hasta las 24 h. Durante este tiempo manteníamos los SERM en el medio, ya que los resultados previos con macrófagos THP-1 (**Fig. 29**) indicaban que una vez retirado el fármaco su efecto se perdía a las 24 h.

Al igual que ocurría en los macrófagos THP-1, la captación de LDL-Ac-[3 H]colesterol por los macrófagos primarios no varió por efecto de ningún SERM, aunque disminuyó ligeramente en presencia de T0 (**Fig. 39A**). Por otro lado, la exportación de [3 H]colesterol en presencia de 10 μ g de colesterol de LDL-Ac/ml y HSA 0,2 %, y sin aceptores específicos, tampoco se vio alterada por efecto de los SERM (**Fig. 39B**).

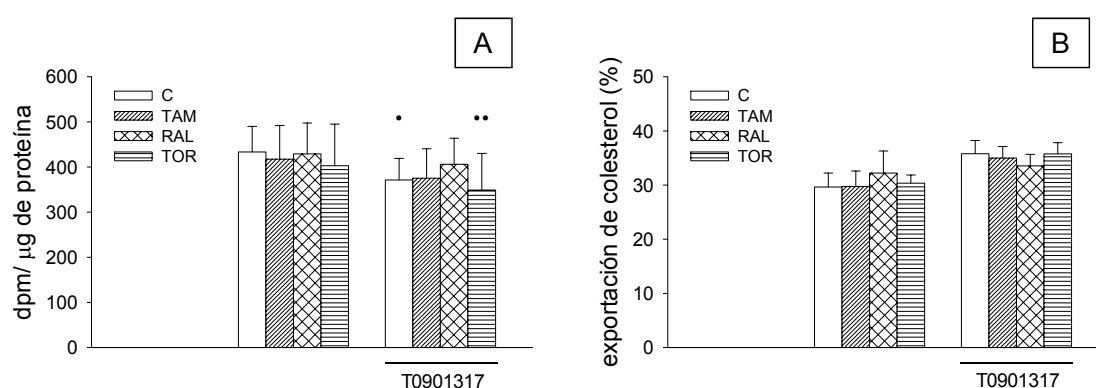


Figura 39. Efecto de los SERM y T0 sobre la captación de LDL-Ac-[3 H]colesterol (A) y la exportación de [3 H]colesterol hacia el medio sin aceptor específico (B) a 24 h en macrófagos primarios humanos marcados con LDL-Ac-[3 H]colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de cinco preparaciones de macrófagos de otros tantos donantes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$.

Los tres SERM disminuyeron la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I (**Fig. 40A**), aunque esta no llegó a ser estadísticamente significativa para el TOR ($p=0,067$), y lo mismo sucedió con la cesión de [3 H]colesterol a HDL (**Fig. 40B**), si bien los efectos de los SERM fueron de menor magnitud que con apo A-I. La adición de T0 aumentó moderadamente la exportación de [3 H]colesterol en las distintas condiciones. En presencia de este activador se redujeron las diferencias entre las células no tratadas y las tratadas con cualquiera de los SERM, lo cual fue así para ambos aceptores de colesterol (**Fig. 40A y 40B**). No obstante, la disminución de la exportación de [3 H]colesterol por efecto de los SERM continuaba siendo patente.

Por lo tanto, si bien los macrófagos primarios requieren la presencia de LDL-Ac en el medio para ceder colesterol a la apo A-I eficientemente, en estas condiciones los efectos de los SERM con ambos aceptores son similares a los observados con los macrófagos THP-1.

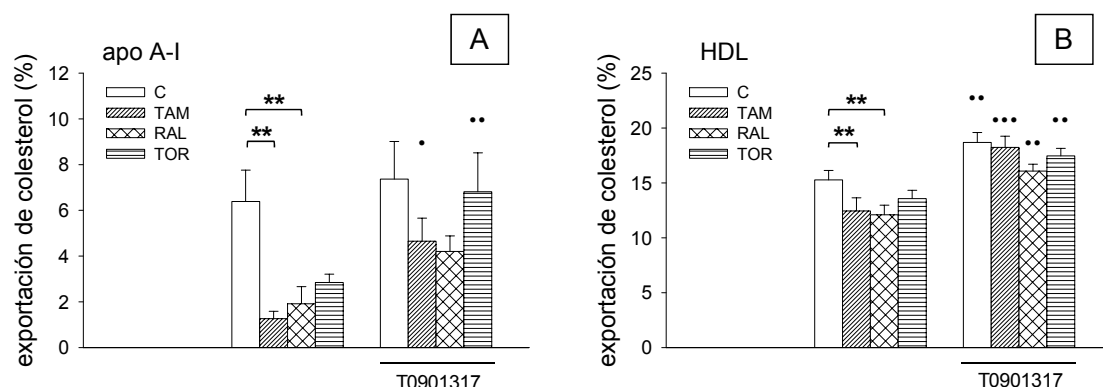


Figura 40. Efecto de los SERM y T0 sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I (A) y HDL (B) a 24 h en macrófagos primarios humanos marcados con LDL-Ac- 3 H]colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de cinco preparaciones de macrófagos de otros tantos donantes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; • $p<0,05$, **/ $\bullet\bullet$ $p<0,01$, $\bullet\bullet\bullet$ $p<0,001$.

3.3. Estudios en macrófagos peritoneales de ratón

Los hallazgos realizados acerca del efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol del macrófago nos llevaron a plantear el estudio del efecto de estos fármacos sobre el TRC desde el macrófago en un modelo de ratón *in vivo*. Por este motivo, quisimos comprobar en primer lugar si los efectos de los SERM que observamos en macrófagos humanos tenían lugar también en macrófagos de ratón. Para ello se aislaron macrófagos peritoneales de ratón (MPR) y, siguiendo un diseño experimental similar al utilizado con los macrófagos humanos, se mantuvieron en medio DMEM con LPDS al 10 % durante 24 h. Luego, añadimos cada uno de los SERM a concentración 10 μ M o vehículo, y 120 μ g de colesterol/ml en forma de LDL-Ac. Transcurridas 24 h desde la adición de los SERM se estudiaron los diferentes aspectos de interés.

3.3.1. *Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular de colesterol*

Para estudiar los efectos de los diferentes SERM sobre la distribución del colesterol celular, tratamos los macrófagos como se describe arriba. Al finalizar los tratamientos fijamos y teñimos las células con filipina para analizar la distribución del colesterol libre y también con Bodipy para la de lípidos neutros.

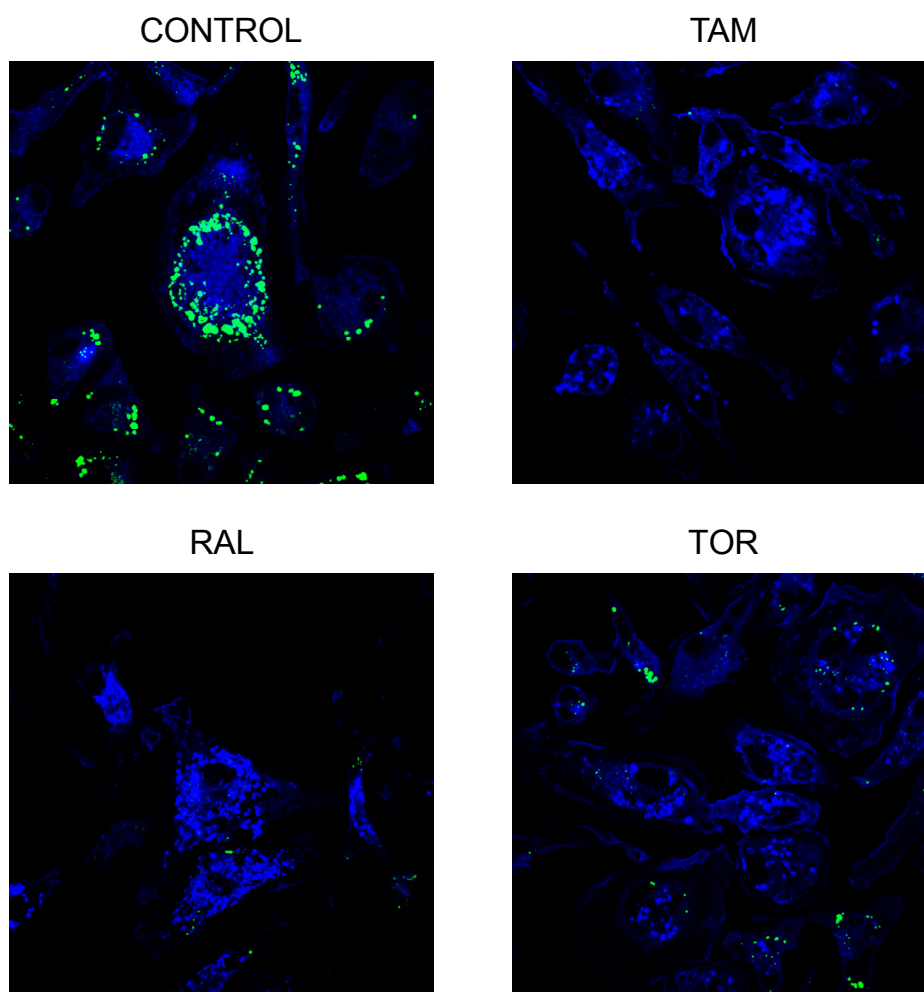


Figura 41. Efecto de los SERM sobre la distribución intracelular de colesterol libre y esterificado en macrófagos peritoneales de ratón. Las células se tiñeron con filipina y Bodipy y se observaron mediante microscopía confocal. Los resultados corresponden a los macrófagos de un ratón representativo de tres ratones.

Al igual que ocurrió con los macrófagos THP-1 y los primarios humanos, el tratamiento de los macrófagos de ratón con TAM, RAL o TOR produjo la formación de acúmulos citoplasmáticos de colesterol libre (en azul), mientras que en la condición control parecía estar distribuido de manera más reticular (**Fig. 41**). También observamos, al igual que en los MPH, la presencia de gotas citoplasmáticas de lípidos neutros (en verde), que corresponderían a ésteres de colesterol,

en la situación control y que eran prácticamente inexistentes en las células tratadas con SERM. Este patrón evidencia que, también en los macrófagos de ratón, los SERM interfieren en la salida del colesterol exógeno del endosoma/lisosoma, impidiendo su esterificación en el retículo endoplásmico.

3.3.2. Efecto de los SERM sobre la exportación del colesterol celular

Los macrófagos se marcaron con [3 H]colesterol disuelto en etanol y en medio DMEM con LPDS al 10 % durante 24 h. A continuación se añadieron los distintos tratamientos y se incubaron las células durante 24 h. La exportación de [3 H]colesterol se dejó transcurrir durante 8 h en medio DMEM con HSA al 0,2%, y en ausencia o presencia de HDL (50 μ g de apo A-I/ml) o apo A-I (50 μ g/ml) como aceptores.

La exportación de colesterol hacia apo A-I disminuyó significativamente, y en la misma medida, con todos los SERM (**Fig. 42A**). Hacia HDL se observó una ligera tendencia a la disminución con los distintos SERM que, en esta serie de experimentos (ver más abajo, **Fig. 44**), no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos (**Fig. 42B**).

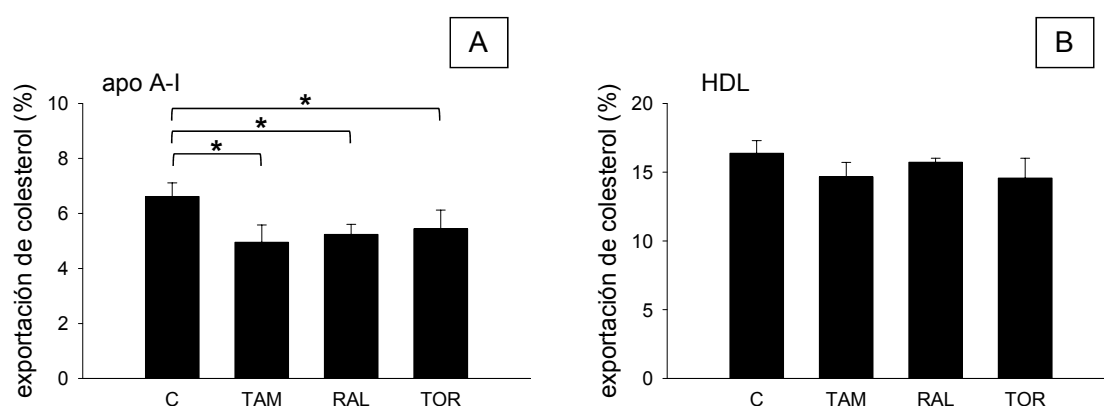


Figura 42. Efecto de los SERM sobre la exportación de [3 H]colesterol hacia apo A-I (A) y HDL (B) en macrófagos peritoneales de ratón marcados con [3 H]colesterol en etanol. Se representan las medias \pm error estándar de los macrófagos de cinco ratones. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para medidas repetidas para cada tiempo, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$.

3.3.3. Papel de los receptores de estrógenos

Quisimos estudiar también la posible implicación de los ER en la distorsión de la distribución y exportación del colesterol celular que producen los SERM. Para ello, los ensayos se realizaron siguiendo los diseños antes descritos pero utilizando medio DMEM sin rojo fenol y suero que había sido tratado con carbón activado para retirar los estrógenos. Las células se incubaron con E2 a dos concentraciones distintas, 25 y 250 nM, o SERM 10 μ M, todos ellos combinados o no con el inhibidor ICI a una concentración de 1 μ M.

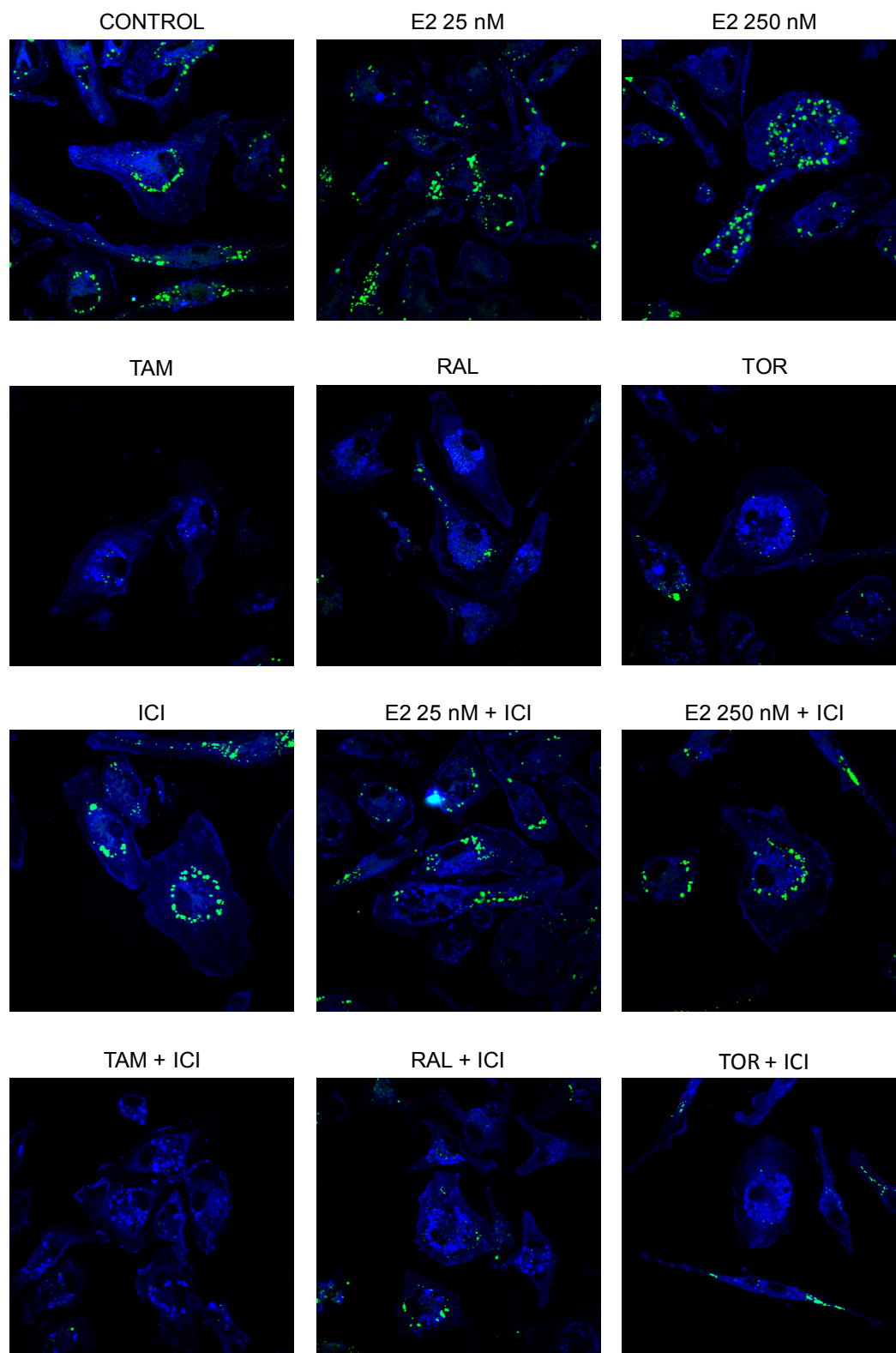


Figura 43. Efecto de los SERM y E2 combinados o no con ICI 182,170 sobre la distribución intracelular de colesterol libre y esterificado en macrófagos peritoneales de ratón. Las células se tiñeron con filipina y Bodipy y se observaron mediante microscopía confocal. Los resultados corresponden a los macrófagos de un ratón representativo de tres ratones.

El tratamiento con E2 no modificó la distribución del colesterol celular respecto al control, en el que, como en todos los casos anteriores, la localización del colesterol libre fue difusa en el citoplasma y el colesterol esterificado se presentó en abundantes gotas citoplasmáticas (**Fig. 43**), todo lo cual diferenciaba claramente a estas células de las tratadas con TAM, RAL o TOR, que indujeron la formación de acúmulos de colesterol libre y redujeron intensamente la presencia de colesterol esterificado (**Fig. 43**). La distribución del colesterol libre y esterificado en las células tratadas con ICI no se diferenció de la del control, como tampoco de la de los macrófagos tratados con E2 combinado con ICI. Además, la combinación con ICI no evitó la formación de los acúmulos de colesterol libre ni la disminución del colesterol esterificado por efecto de los SERM (**Fig. 43**). Estos resultados sugieren que los efectos de los SERM sobre la distribución intracelular de colesterol no están mediados por los ER.

A continuación comparamos los efectos de E2 con los de los SERM sobre la exportación de [3 H]colesterol. En estos ensayos los efectos inhibitorios de los tres SERM sobre la salida de colesterol hacia apo A-I fueron estadísticamente significativos y con magnitudes equiparables entre sí (**Fig. 44A**). Los tres SERM también disminuyeron significativamente la salida de [3 H]colesterol hacia HDL, siendo el RAL el más potente (**Fig. 44B**). Sin embargo, ninguna de las dos concentraciones de E2 alteró la exportación de [3 H]colesterol hacia ninguno de los dos aceptores respecto a la condición control, dando dicha hormona valores significativamente mayores que cualquier SERM. En consonancia con ello, el ICI no modificó el comportamiento de ninguno de estos agentes (**Fig. 44**). Estos resultados indican que el efecto de los SERM sobre la exportación de colesterol no está mediado por los ER.

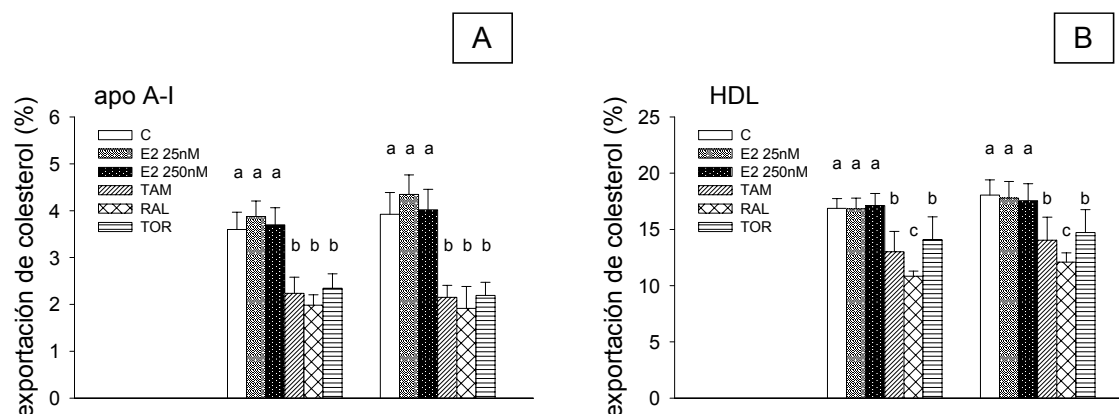


Figura 44. Exportación de [3 H]colesterol a 8 h por macrófagos peritoneales de ratón tratados o no con E2, SERM o vehículo combinados o no con ICI 182,170, hacia apo A-I (A) y HDL (B) en células marcadas con [3 H]colesterol en etanol. Se representan las medias \pm error estándar de los macrófagos de cinco (A) y cuatro (B) ratones. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de dos vías para medidas repetidas, y post hoc mediante el test de Student Newman Keuls; entre las barras con distinta letra existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4. Efecto del TAM y el RAL sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos en ratones.

La exportación del colesterol celular, que acabamos de estudiar en varios tipos de macrófagos, es el primer paso del proceso de TRC. Los resultados previos han demostrado que los SERM afectan a la exportación del colesterol hacia apo A-I y HDL *in vitro*. Por ello, nos preguntamos si estos fármacos alteraban el TRC desde los macrófagos *in vivo*.

Para evaluar esta posibilidad utilizamos un modelo de ratón *in vivo*. Los ratones se alimentaron con una dieta tipo *western* durante 4 semanas. En los últimos 10 días de esta dieta se les administró, por sonda intragástrica, 0,25 mg/día (≈ 10 mg/Kg/día) de TAM o RAL o solo vehículo. Por otra parte, aislamos macrófagos peritoneales de otros ratones alimentados con la misma dieta, los marcamos con [3 H]colesterol y los tratamos con TAM 10 μ M, RAL 10 μ M, o vehículo, y 120 μ g de colesterol/ml de LDL-Ac durante 24 h, siguiendo el mismo diseño que el utilizado con los MPR en los estudios *in vitro* (apartado 3.3.2). Estos macrófagos se inyectaron intraperitonealmente a los ratones tratados con el SERM correspondiente o vehículo, respectivamente, 48 h antes del sacrificio. Se colectaron las heces a partir de ese momento hasta el final del experimento, momento en el que se tomó también suero e hígado de cada ratón para analizarlos.

4.1. Efecto del TAM y el RAL sobre los lípidos plasmáticos y hepáticos

Tanto el TAM como el RAL disminuyeron significativamente la concentración sérica de colesterol debido, fundamentalmente, a la disminución también significativa que produjeron en la concentración del colesterol-HDL, la fracción mayoritaria en estos animales, si bien el colesterol no asociado a HDL (no HDL) mostró una tendencia a la disminución (**Fig. 45A**). El tratamiento con TAM aumentó la concentración de triglicéridos plasmáticos de manera estadísticamente significativa respecto al tratamiento con RAL, pero no respecto al grupo control (**Fig. 45A**). En el hígado no se observaron cambios significativos en las concentraciones de colesterol y triglicéridos, aunque sí cierta tendencia a la disminución de estos lípidos por efecto de los SERM (**Fig. 45B**).

A continuación analizamos el perfil sérico de lipoproteínas por FPLC. Éste mostró que el TAM aumentó la concentración de triglicéridos contenidos en las VLDL respecto a los otros dos grupos de ratones (**Fig. 46**), coherente con el aumento en los triglicéridos séricos (**Fig. 45A**). En la fracción de las HDL se registró, como cabía esperar, una disminución en la concentración de colesterol por efecto de ambos SERM (**Fig. 46**). Esta disminución afectaba también a las HDL de mayor tamaño (HDL₁), como indica la menor cantidad de colesterol obtenida entre los 12,4 y 13,6 ml de la elución (**Fig. 46**). Dado que las HDL₁ son ricas en apo E, éstas también precipitan por efecto del ácido fosfotungstácico/MgCl₂, lo que puede explicar la tendencia a la disminución que mostraba el colesterol no HDL tras el tratamiento con TAM o RAL (**Fig. 45A**).

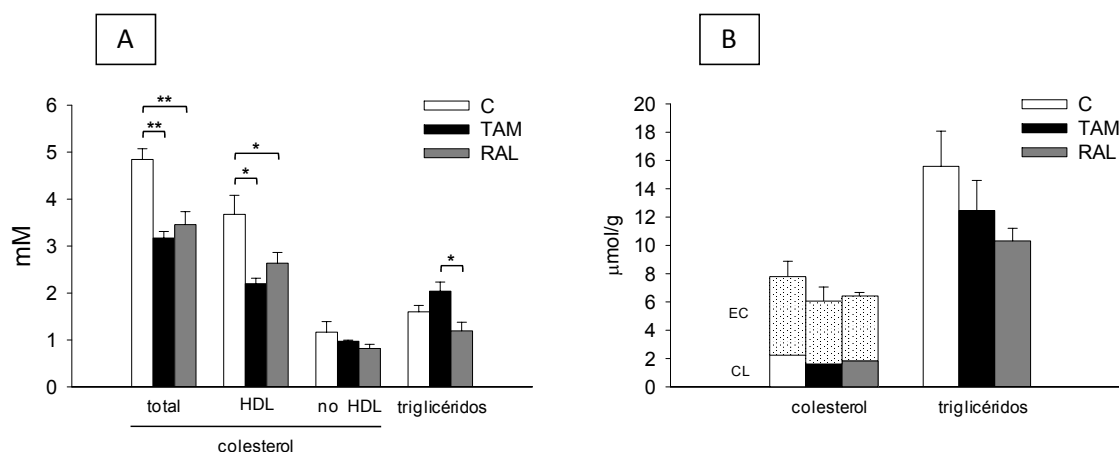


Figura 45. Efecto del TAM y el RAL sobre la concentración de colesterol y triglicéridos en suero (A) e hígado (B). CL: colesterol libre; EC: ésteres de colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de cinco ratones por grupo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para cada determinación, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

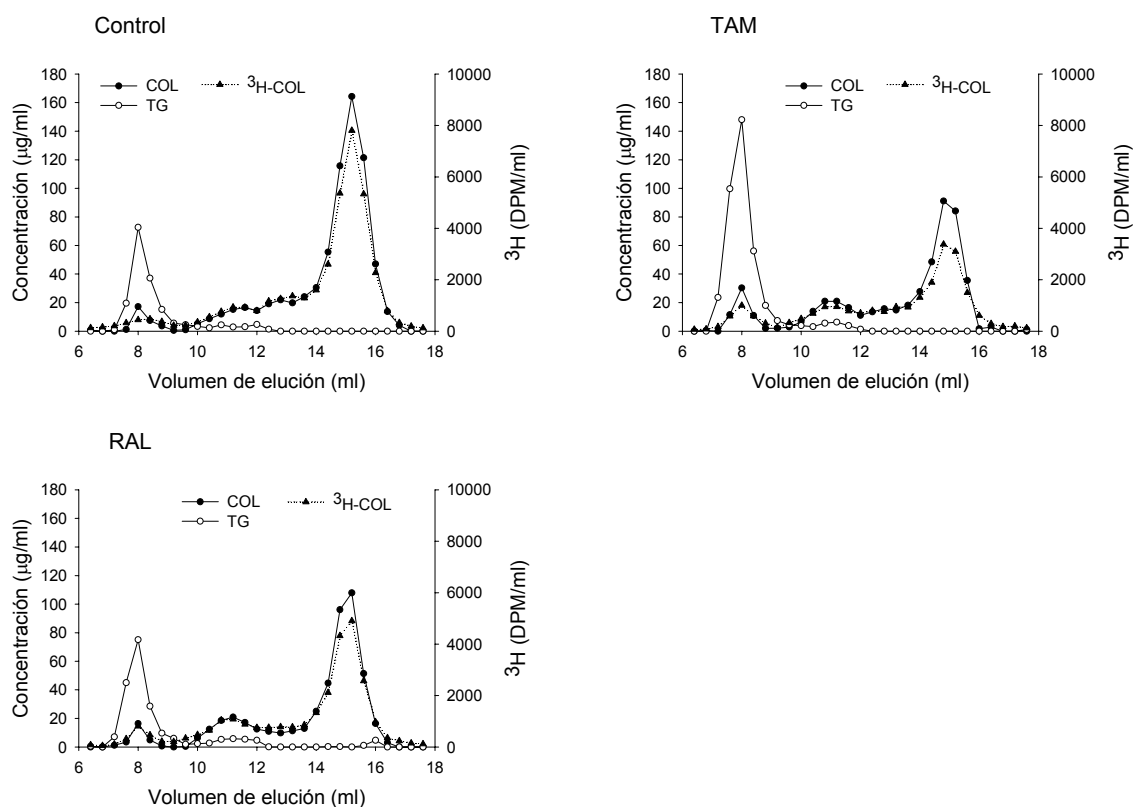


Figura 46. Efecto del TAM y el RAL sobre el perfil sérico de lipoproteínas mediante FPLC. Se representan los perfiles de las mezclas de los sueros de cuatro ratones por grupo. Las DPM están normalizadas respecto a la cantidad de DPM cromatografiadas en el caso de los animales control.

4.2. Efecto del TAM y el RAL sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos

En este apartado nos centraremos en describir el destino del [^3H]colesterol proveniente de los macrófagos inyectados intraperitonealmente. El tratamiento con TAM produjo un claro descenso en la concentración sérica de [^3H]colesterol (en % de la dosis inyectada/ml) a las 48 h de la inyección de los macrófagos y que coincidió con una importante disminución en la de [^3H]colesterol-HDL (**Fig. 47A**). A diferencia de lo que ocurrió con el colesterol frío, el RAL solo produjo un moderado decremento del [^3H]colesterol total y asociado a HDL, que no llegó a ser significativo respecto a la condición control. El porcentaje de [^3H]colesterol de la fracción no HDL no varió significativamente por efecto de los SERM (**Fig. 47A**). Como puede apreciarse en los perfiles cromatográficos mediante FPLC (**Fig. 46**), el perfil de elución de [^3H]colesterol fue paralelo en todos los casos al correspondiente al colesterol químico, lo cual indica que el trazador, tras pasar a la circulación desde los macrófagos, había sido reutilizado en el hígado para la síntesis y secreción de lipoproteínas, con especial mención de las VLDL, precursoras de las LDL. Por otro lado, puede observarse que la disminución de la cantidad de [^3H]colesterol incorporado a las HDL de los ratones que recibieron TAM respecto a los que recibieron RAL o vehículo fue proporcionalmente mayor que la disminución del colesterol-HDL (**Figs. 46 y 47A**), es decir, las HDL de los animales tratados con TAM contenían una menor cantidad de trazador por unidad de masa de colesterol ($1,091 \pm 0,049$ % de la dosis inyectada/mg de colesterol-HDL) que los tratados con RAL ($1,470 \pm 0,063$ %, $p = 0,001$) y los controles ($1,330 \pm 0,043$ %, $p = 0,01$).

En el hígado el TAM disminuyó significativamente la cantidad de [^3H]colesterol total a las 48 h de la inyección de los macrófagos, debido, fundamentalmente, a un descenso en la cantidad de [^3H]colesterol esterificado, que pasó de ser un 50 % del [^3H]colesterol total en el grupo control a un 23 % en el tratado con TAM, diferencia porcentual estadísticamente significativa (**Fig. 47B**). Curiosamente, el RAL no alteró la cantidad de [^3H]colesterol total en el hígado, sin embargo, el porcentaje de dicho colesterol que se encontró esterificado fue menor que en el grupo control y similar al del tratado con TAM (**Fig. 47B**).

La excreción en las heces es el destino final del colesterol cargado en los macrófagos. En ellas disminuyó la cantidad de [^3H]trazador total por efecto del TAM, debido fundamentalmente a la disminución del [^3H]colesterol. La cantidad de trazador incorporada a ácidos biliares fue muy baja en comparación con la de [^3H]colesterol y no cambió con los tratamientos. La baja proporción de [^3H]ácidos biliares en heces puede deberse a la elevada reabsorción intestinal de ácidos biliares descrita para los ratones [386]. El tratamiento con RAL no se diferenció del control (**Fig. 47B**). Así pues, mientras que ambos SERM eran capaces de reducir la concentración de HDL, solo el TAM disminuía el transporte de colesterol desde los macrófagos hasta las heces, resultado que se correlacionaba con la menor cantidad de trazador presente en el suero y el hígado por efecto de dicho fármaco.

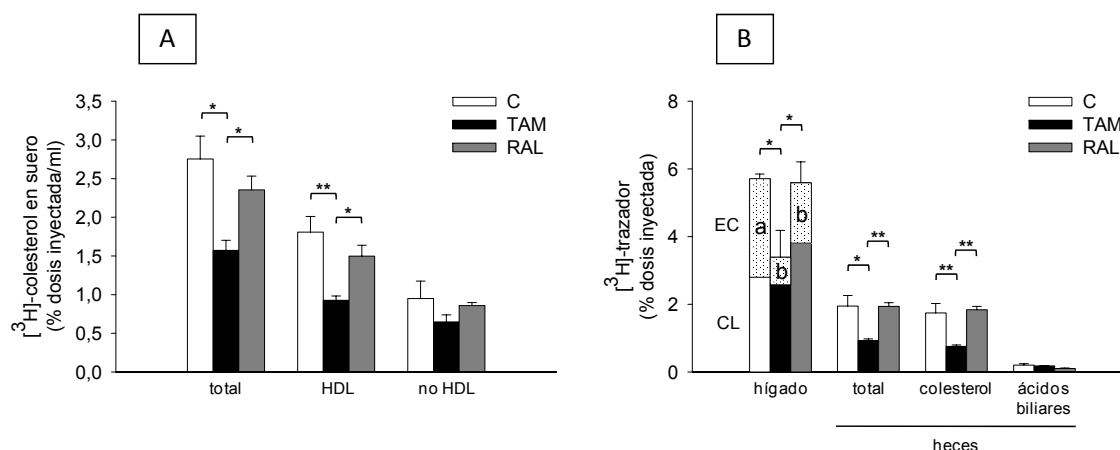


Figura 47. Efecto del TAM y el RAL sobre la concentración de $[^3\text{H}]$ colesterol en suero (A) y la distribución del ^3H en hígado y heces (B). CL: colesterol libre; EC: ésteres de colesterol. Se representan las medias \pm error estándar de cinco ratones por grupo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para cada determinación, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; entre las barras que no comparten ninguna letra existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.3. Efecto del TAM y el RAL sobre la composición, funcionalidad y aclaramiento de las HDL en ratones

Los resultados anteriores han mostrado que el TAM y el RAL disminuyen la concentración de colesterol-HDL en los ratones. Además, la actividad específica del ^3H de estas partículas disminuía por efecto del TAM. Por ello, nos propusimos estudiar el efecto de estos SERM sobre las propiedades de las HDL, incluyendo su composición química, su capacidad comoceptoras del colesterol de los macrófagos y su tasa de aclaramiento *in vivo*.

Para abordar estas cuestiones alimentamos ratones con una dieta tipo *western* y los tratamos con 0,25 mg/día de TAM o RAL, o vehículo igual que anteriormente. Parte de los ratones de cada grupo de tratamiento fueron sacrificados para obtener el plasma y aislar sus HDL, las cuales se utilizaron para los estudios posteriores, y el resto de los ratones se utilizaron para el estudio *in vivo*.

Comenzamos comprobando que, al igual que había ocurrido anteriormente (ver Fig. 45), en los ratones donantes de HDL el TAM y el RAL disminuyeron la concentración del colesterol plasmático, siendo la diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control y, en esta ocasión, reduciéndose significativamente más con el TAM que con el RAL (Fig. 48A). La composición de las HDL también varió por efecto de los SERM (Fig. 48B). Estos aumentaron significativamente la proporción de triglicéridos y disminuyeron la de ésteres de colesterol. Además, el TAM disminuyó la proporción de fosfolípidos respecto a las HDL de los ratones

RESULTADOS

control y los tratados con RAL, y aumentó la de proteínas respecto a la del control. La proporción de colesterol libre se mantuvo constante en todos los casos (**Fig. 48B**).

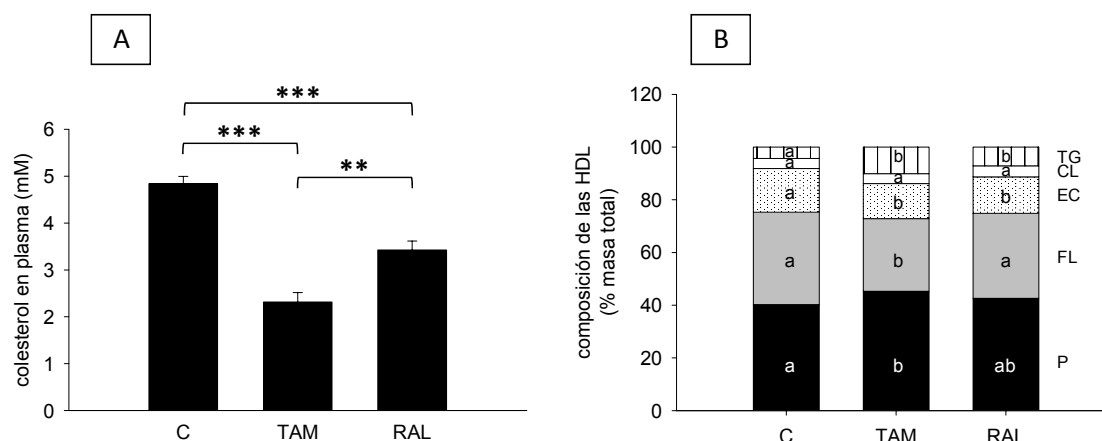


Figura 48. Efecto de los SERM sobre la concentración plasmática de colesterol (A) y la composición de las HDL (B). TG: triglicéridos; CL: colesterol libre; EC: ésteres de colesterol; FL: fosfolípidos; P: Proteínas. Se representan las medias \pm error estándar de cuatro ratones por grupo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para cada determinación, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; entre las barras que no comparten ninguna letra existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El siguiente paso fue medir la capacidad de estas HDL y de los plasmas correspondientes para captar el colesterol de los macrófagos. Para ello, marcamos MPR con [^3H]colesterol en etanol y los cargamos con colesterol de LDL-Ac de manera similar a la de los ensayos anteriores de exportación de colesterol. La exportación se cuantificó tras 8 h de incubación de los macrófagos en medio DMEM con BSA al 0,2 % solo o con las distintas HDL (40 μg de proteína); para evaluar los plasmas, la exportación se ensayó en medio DMEM solo o con cada uno de los plasmas al 1 %.

La capacidad para captar colesterol de las HDL de los ratones tratados con TAM y RAL disminuyó ligera aunque significativamente respecto a las HDL de los animales control, mostrando las HDL de los animales con TAM menor capacidad que las de los que recibieron RAL (**Fig. 49A**). Estos resultados indican que el RAL y, especialmente, el TAM no solo disminuyen la concentración de HDL sino que también cambian su composición y alteran su capacidad para captar el exceso de colesterol celular. Por su parte, el plasma de los ratones tratados con TAM fue menos efectivo en la extracción de [^3H]colesterol que el plasma de los animales que recibieron RAL o vehículo, mientras que los plasmas de estos dos últimos se comportaron de manera similar (**Fig. 49B**).

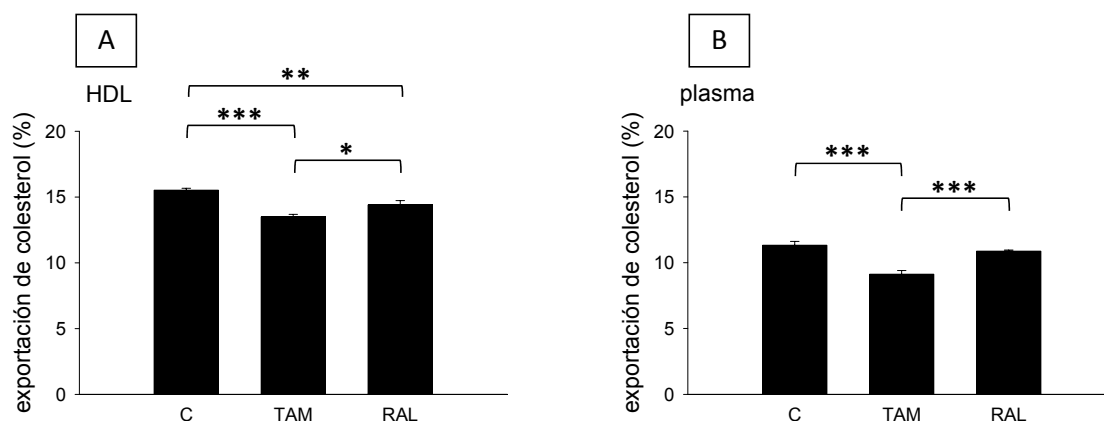


Figura 49. Efecto del TAM y el RAL sobre la capacidad de las HDL (A) y el plasma (B) como aceptores del $[^3\text{H}]$ colesterol de macrófagos de ratón. Se representan las medias \pm error estándar de cuatro ratones por grupo en A y cuatro ratones control, cuatro tratados con TAM y cinco tratados con RAL en B. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A continuación, estudiamos el efecto de los SERM sobre el catabolismo de las HDL. Para ello, las HDL de los ratones donantes pertenecientes a los distintos grupos de tratamiento se marcaron con oleato de $[^3\text{H}]$ colesterol, se inyectaron a ratones receptores previamente tratados con el mismo SERM o vehículo que los donantes respectivos (HDL “autólogas”) y se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos hasta las 48h. El tratamiento con RAL y, en mayor medida, con TAM aumentó notablemente el aclaramiento de las HDL marcadas, siendo las diferencias claramente patentes desde los primeros tiempos (**Fig. 50A**). No obstante, las diferencias en la concentración de trazador entre los animales tratados con RAL y los tratados con vehículo fueron disminuyendo a partir de las 24 h, probablemente condicionado por la síntesis y secreción hepática de lipoproteínas que reincorporaron el $[^3\text{H}]$ colesterol. La tasa catabólica fraccional estimada para las HDL en los ratones tratados con TAM fue significativamente mayor que con los otros dos tratamientos, mientras que el aumento con el RAL no alcanzó significación estadística (**Fig. 50B**).

RESULTADOS

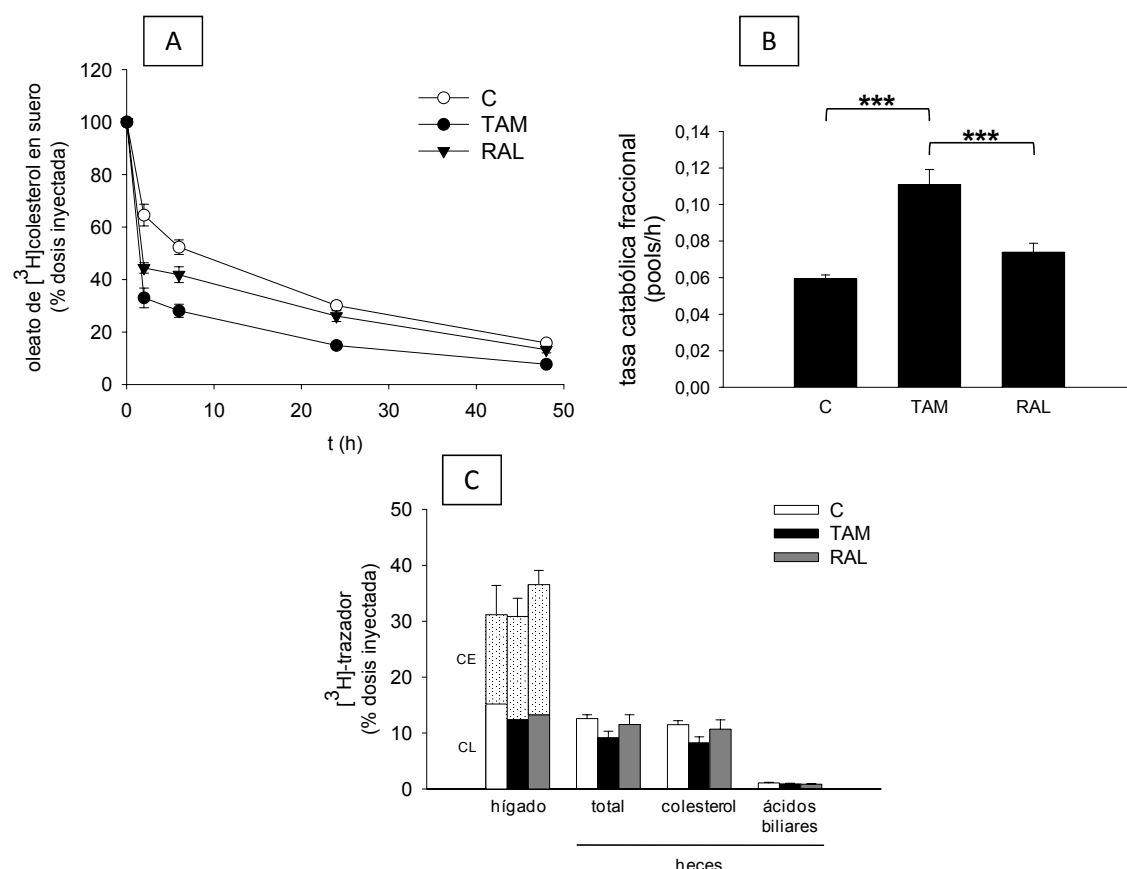


Figura 50. Efecto del TAM y el RAL sobre el aclaramiento de oleato de ^3H colesterol-HDL (A), tasa catabólica fraccional (B) y la distribución del ^3H presente en hígado y heces a las 48 h (C). Se representan las medias \pm error estándar de cuatro ratones control, cuatro tratados con TAM y cinco tratados con RAL. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía para cada determinación, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls; *** $p < 0,001$.

Cuando determinamos la cantidad de trazador en el hígado al final del experimento, no aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Tampoco se observaron diferencias en la distribución del ^3H en colesterol libre y esterificado (**Fig. 50C**). No obstante, la proporción de ^3H colesterol esterificado en los animales tratados con cualquiera de los SERM fue mayor que en los animales tratados de igual manera pero a los que se inyectaron macrófagos con ^3H colesterol (ver **Fig. 47B**) en lugar de HDL con oleato de ^3H colesterol. Por otro lado, el TAM disminuyó la cantidad de ^3H total y la de ^3H colesterol presentes en las heces, aunque en ningún caso este efecto fue estadísticamente significativo (**Fig. 50C**). Como puede apreciarse, dichas disminuciones fueron de menor magnitud que cuando el ^3H colesterol procedía de los macrófagos (ver **Fig. 47B**). Los SERM no modificaron la cantidad de trazador en ácidos biliares, cuya proporción fue nuevamente muy pequeña (**Fig. 50C**).

Así pues, la reducción en la concentración de colesterol-HDL causada por el TAM y el RAL en los ratones se asocia a un acelerado catabolismo del colesterol contenido en esas partículas.

Además, el TAM y, en menor medida, el RAL alteran la calidad de las HDL, de manera que su capacidad para extraer colesterol de los macrófagos se ve mermada.

4.4. Efecto del TAM y el RAL sobre la expresión hepática e intestinal de moléculas implicadas en el transporte reverso de colesterol

Al final de los tratamientos evaluamos la expresión hepática e intestinal de diferentes genes claves en el proceso de TRC. En el hígado, la expresión de los genes Abca1 y Abcg1, ambos dianas de LXR que en este órgano participan en la provisión de colesterol para la formación de las partículas HDL, no cambiaron por efecto de ninguno de los dos SERM. Tampoco modificaron la expresión de Scarb1 (codifica SR-BI) ni de Ldlr, implicados en la captación de colesterol lipoproteico. Por otro lado, aunque los SERM aumentaron ligeramente la expresión de Cyp7a1, implicado en la síntesis de ácidos biliares, aquélla no llegó a ser estadísticamente significativa (**Fig. 51**). Sin embargo, el tratamiento con TAM redujo significativamente la concentración del mRNA de los transportadores ABCG5 y ABCG8, dianas ambas de LXR que forman un exportador heterodimérico de esteroides. De manera distinta, el tratamiento con RAL no tuvo efecto alguno sobre estos dos genes respecto a los animales control (**Fig. 51**).

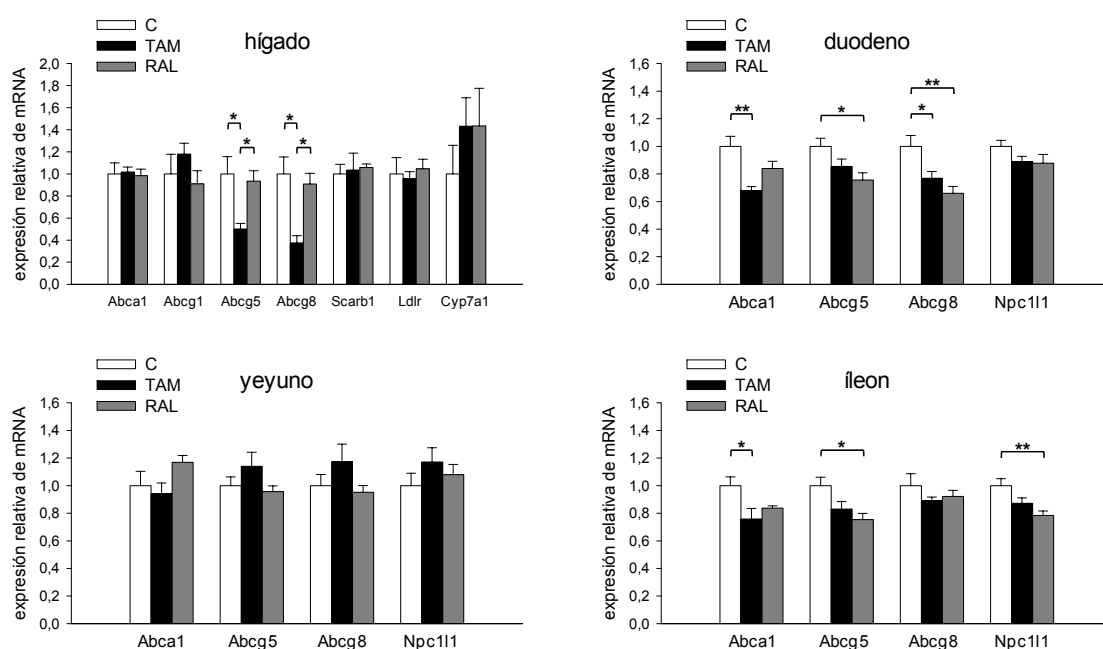


Figura 51. Efecto del TAM y el RAL sobre la expresión génica de moléculas implicadas en el transporte reverso de colesterol en hígado, duodeno, yeyuno e íleon. En las gráficas se representa la expresión relativa de cada uno de los genes normalizada por la expresión del control invariable CypB. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar de cinco ratones por grupo. Se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls para cada gen; *p<0,05, **p<0,01.

RESULTADOS

En el duodeno (**Fig. 51**) disminuyó significativamente la expresión de *Abca1* y *Abcg8* por efecto del TAM. Al igual que éste, el RAL redujo la expresión de *Abcg8*. El TAM y el RAL disminuyeron la expresión de *Abcg5* aunque solo el efecto del RAL alcanzó significación estadística (**Fig. 51**). En el yeyuno, ninguno de los SERM tuvo efecto sobre la expresión de los genes estudiados (**Fig. 51**). En cuanto al íleon, *Abcg5* y *Npc1l1*, implicado este último en la absorción de colesterol, disminuyeron por el tratamiento con RAL, mientras que el TAM disminuyó la expresión de *Abca1* (**Fig. 51**). En conjunto, los resultados referentes al intestino delgado indican que, exceptuando el cambio en *Npc1l1* en el íleon, el tratamiento de ratones con estos SERM puede resultar en la inhibición de la expresión de genes que son dianas de LXR y codifican transportadores de esteroides que se localizan en la MP.

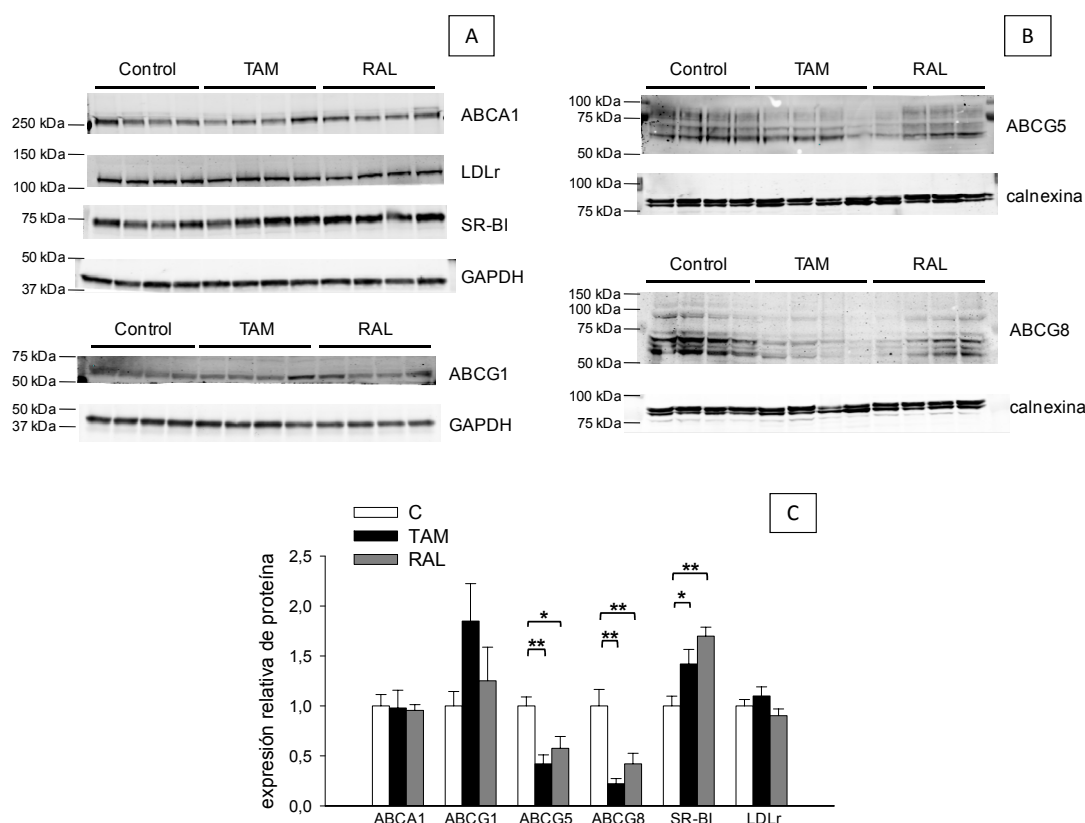


Figura 52. Efecto del TAM y el RAL sobre la expresión hepática de proteínas implicadas en el transporte reverso de colesterol. Se representan los *western blot* de 100 µg de lisado hepático total (A) y de membranas celulares aisladas de hígado (B) y expresión relativa de proteína (C). Cada calle de A y B corresponde a la muestra de un ratón distinto. En C, los resultados están expresados como la relación entre la densidad óptica de cada proteína y su control de carga y normalizada por la media de las muestras control a la que se dio valor uno. Se representan las medias \pm error estándar de cuatro ratones por grupo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el test ANOVA de una vía, y post-hoc mediante el test de Student-Newman-Keuls para cada molécula; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Quisimos comprobar si los cambios de expresión génica en el hígado se correspondían efectivamente con cambios en la cantidad de proteína de las moléculas de interés mediante *western blot*. No se observaron cambios en la cantidad de proteína de ABCA1 ni en la del rLDL por efecto de ninguno de los SERM, al igual que sucedió con la expresión génica (**Fig. 52**). En el caso de ABCG1, éste mostró una tendencia al aumento por efecto del TAM, pero el cambio no fue significativo. Como puede observarse en la **Fig. 52**, el *western blot* de ABCG5 y ABCG8 resultó, en cada caso, en varias bandas, las cuales, según se ha descrito [234, 387], corresponden a moléculas con distinto grado de glicosilación y pesos moleculares comprendidos entre 70 y 90 kDa aproximadamente. Así pues, cuantificamos las tres y las cuatro bandas más intensas para ABCG5 y ABCG8, respectivamente, comprendidas en este rango de pesos moleculares (**Fig. 52B**). El TAM disminuyó significativamente la expresión de ABCG5 y ABCG8, cuyo cometido es transferir colesterol desde el hepatocito al canalículo biliar para su excreción en la bilis. Este cambio se correspondía con el efecto del TAM observado sobre sus respectivos mRNA. Sin embargo, el RAL, en contraste con los resultados de mRNA, también disminuyó significativamente la expresión de ABCG5 y ABCG8, aunque en menor grado que el TAM (**Fig. 52**).

Por último, el TAM y el RAL indujeron sendos aumentos significativos en la cantidad de SR-BI (**Fig. 52**), a pesar de no verse alterada a este tiempo la expresión de Scarb1. Dado que dicho receptor media la captación selectiva del colesterol de las HDL, el incremento en su expresión pudiera estar implicado en el aumento del catabolismo de estas partículas por efecto de ambos SERM.

DISCUSIÓN

Los SERM son fármacos caracterizados por su capacidad para modular los ER, ejerciendo un efecto agonista o antagonista en función del tejido o célula diana. Por ello, algunos SERM son muy utilizados en la clínica, como es el caso del TAM y el TOR para el tratamiento del cáncer de mama y del RAL para la osteoporosis [358]. Sin embargo, se conoce que estos fármacos tienen efectos hipocolesterolemiantes, disminuyendo fundamentalmente las concentraciones plasmáticas del colesterol-LDL [322, 327, 328, 348, 349]. A estos efectos pueden contribuir tanto el aumento de expresión del rLDL, como ocurre en células tratadas con TAM [334, 336], como la disminución de la biosíntesis de colesterol que dichos SERM producen [331-334]. En lo que se refiere al rLDL, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el TAM interfiere en el tráfico intracelular de colesterol en células MOLT-4, lo que produce un aumento de expresión y actividad del rLDL [334]. Además, al combinar TAM con LOV se producía un aumento sinérgico en estos parámetros [334]. Con estos antecedentes y dado su amplio uso en clínica, nos propusimos profundizar en el estudio de los efectos del TAM y de los SERM de segunda generación RAL y TOR sobre la homeostasis del colesterol y, especialmente, la exportación del colesterol celular y la repercusión de dichos fármacos sobre el proceso de TRC desde el macrófago.

Como resultados más destacados, en el presente estudio hemos establecido que el TAM, RAL y TOR inhiben el tráfico intracelular del colesterol lipoproteico disminuyendo, de este modo, la llegada del mismo al RE. En consonancia con esto, aumenta el procesamiento de SREBP y la expresión de sus genes diana. Por otra parte, hemos demostrado que estos SERM inhiben la expresión de proteínas implicadas en la exportación del colesterol celular, así como la exportación de este lípido por los macrófagos. Además, hemos constatado que el TAM y el RAL disminuyen la concentración del colesterol-HDL y aumentan el catabolismo del mismo en el ratón. Sin embargo, el TAM, pero no el RAL, reduce el TRC desde los macrófagos.

1. Efecto de los SERM sobre el tráfico intracelular de colesterol y la expresión de genes reguladores de la homeostasis celular del colesterol

Como hemos indicado, los resultados muestran que los tres SERM causan la acumulación intracelular de colesterol libre en todos los tipos celulares estudiados e independientemente del origen de los mismos. El fenotipo celular resultante recuerda al de las células deficientes en NPC1 o NPC2 [131], lo que sugiere la interrupción del transporte del colesterol de origen lipoproteico a nivel de los ET/L. La inhibición que producen los SERM sobre el tráfico endosomal de colesterol ha quedado especialmente patente en células MOLT-4, en las que aparecían acúmulos citoplasmáticos de colesterol cuando este se suministraba en forma de LDL y no cuando se suministraba acomplexado con MCD. Los complejos de MCD con análogos fluorescentes del colesterol se han utilizado anteriormente para estudios de tráfico intracelular de colesterol y han permitido constatar que, a diferencia de las LDL, aquéllos suministran colesterol a las células sin que este pase, a tiempos cortos, por los endosomas tardíos ni los lisosomas, si bien puede incorporarse cierta cantidad a los endosomas de reciclaje [116]. La presencia de acúmulos citoplasmáticos de colesterol en las células tratadas con SERM y LDL,

pero no en aquellas a las que el colesterol se suministró acompañado con MCD, permite, por tanto, restringir los efectos de los SERM a la vía endosomal de transporte de colesterol. En este estudio hemos comprobado, además, que la interrupción del tráfico intracelular de colesterol producida por los SERM también ocurre en los macrófagos expuestos a LDL-Ac, como pudimos observar en macrófagos THP-1, y primarios humanos y de ratón.

Los resultados obtenidos al analizar los efectos de los SERM sobre la expresión génica están en consonancia con la interrupción del tráfico intracelular del colesterol lipoproteico. Esta inhibición impediría la llegada del colesterol al RE, donde reside el complejo INSIG-SCAP-SREBP, esencial en la regulación de la expresión de genes clave para la homeostasis celular del colesterol. Este lípido induce la retención de SREBP en el RE, inhibiendo así su escisión y la consiguiente activación de los mecanismos celulares para generar o captar colesterol [249]. La consecuencia del bloqueo del tráfico de colesterol por los SERM es el aumento del procesamiento de SREBP, a pesar de la provisión de colesterol con las LDL, como observamos en las células HepG2. Como cabía esperar, la activación de este factor de transcripción se asoció a la estimulación de la expresión de sus genes diana, tal y como observamos con las distintas líneas celulares tratadas con cada uno de los SERM en presencia de LDL. Sin embargo, los SERM no impidieron la inhibición de la expresión de las dianas de SREBP inducida por ColMCD, efecto que no requiere la mediación de la vía endosomal. La inhibición del tráfico intracelular del colesterol lipoproteico impediría, además, que éste llegue a la enzima ACAT-1, que también reside en el RE y la cual se encarga de esterificar el colesterol. Prueba de ello fue la disminución de la cantidad de gotas de colesterol esterificado en el citoplasma de los MPH (**Fig. 36**) y MPR (**Fig. 41**) tratados con SERM respecto a las células control.

El conjunto de genes con expresión incrementada por los SERM que más destacó mediante el análisis con los microarrays de DNA fue, por numeroso, el de los genes de enzimas de la biosíntesis de colesterol, dianas principalmente de SREBP-2. No obstante, dichos fármacos también aumentaron la expresión de dianas de SREBP-1c, como SCD e INSIG1. SCD codifica la esteroil-CoA desaturasa, implicada en la lipogénesis, ruta metabólica activada por SREBP-1c [254]. Esto sugiere que los SERM podrían estimular la lipogénesis *in vivo* y contribuir así al aumento de la incidencia de esteatosis hepática descrita para el TAM y, en menor medida, para el RAL y el TOR [388, 389]. Este mecanismo también podría estar implicado en la hipertrigliceridemia descrita en algunos pacientes tratados con TAM [341, 390].

Entre las dianas de SREBP-2 cuya expresión estimulan los SERM también debemos destacar a LDLR. En este estudio reportamos que el RAL y el TOR aumentan la expresión de LDLR de forma comparable al TAM, con el que ya se había observado tal efecto [334], en tres líneas celulares muy diferentes, como son los linfoblastos MOLT-4, hepatocitos HepG2 y macrófagos THP-1. Este aumento de expresión podría contribuir a los efectos hipocolesterolemiantes descritos cuando se trata a pacientes con cualquiera de estos SERM [322, 327, 328, 348, 349].

Nuestro grupo había descrito que el TAM y la LOV estimulan sinérgicamente la expresión de LDLR en células MOLT-4 [334]. En el presente estudio hemos demostrado que el RAL y el TOR también tienen un efecto sinérgico con el de la LOV sobre la expresión de LDLR en células MOLT-4 y HepG2; de hecho, los tres SERM estimulan sinérgicamente con la estatina la expresión de distintas dianas de SREBP. De manera coherente con esto, el efecto sinérgico también tiene lugar sobre el procesamiento de SREBP-2, lo que apoya la implicación directa de la vía de los

SREBP y permite proponer el siguiente mecanismo. Como ya hemos comentado, la interrupción del tráfico del colesterol de las LDL por los SERM estimula el procesamiento de SREBP-2 y la expresión de sus genes diana. Cuando se suministra LOV como único fármaco ésta no produce efecto alguno dado que, aunque la LOV inhiba la biosíntesis de colesterol, predomina el efecto represor del colesterol de las LDL sobre el procesamiento de SREBP-2 (**Fig. 11**). Sin embargo, cuando la LOV se combina con cualquiera de los SERM se observan mayores efectos que con el correspondiente SERM solo, dado que, al estar bloqueada la llegada del colesterol lipoproteico al RE, la vía de los SREBP deviene sensible a la inhibición de la biosíntesis de colesterol. Es decir, en esta situación el suministro de colesterol endógeno es crítico para la célula, por lo que la inhibición de la biosíntesis producida por la LOV sí es relevante, y la célula responde activando más sus mecanismos de aprovisionamiento de colesterol. El resultado final es un efecto sinérgico entre ambos tipos de fármaco.

El hecho de que los SERM tengan un efecto sinérgico con estatinas sobre la expresión del rLDL es clínicamente relevante, ya que un tratamiento combinado con ambos tipos de fármacos podría resultar en una reducción de la concentración de LDL mayor que con cada monoterapia. Además, esta estrategia permitiría administrar dosis bajas de uno o ambos tipos de fármaco con la finalidad de prevenir efectos secundarios. Los resultados de un estudio clínico en el que se administraron RAL y bajas dosis de simvastatina conjuntamente a mujeres posmenopáusicas avalan este tipo de terapia. Así, los autores observaron una disminución de las concentraciones de colesterol-LDL y apo B mayor que con cada fármaco por separado [391]. En cualquier caso, se requieren más datos sobre la eficacia y seguridad de los tratamientos combinados con SERM y estatinas antes de que puedan establecerse como terapia frente a la hipercolesterolemia.

La LOV, por sí sola, tampoco alteró la expresión de las dianas de SREBP en los macrófagos THP-1. Sin embargo, aquel fármaco no produjo ningún efecto sinérgico con los SERM en estas células. Aunque no conocemos el mecanismo responsable, esto podría deberse a que los macrófagos THP-1, a diferencia de las células MOLT-4 y HepG2, son células no proliferantes, lo que reduce considerablemente sus requerimientos de colesterol y, así, la tasa de biosíntesis de este lípido, tal y como pudimos comprobar al inducir la diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos (**Fig. 25**). Sería posible, entonces, que estas células fuesen menos sensibles a la inhibición por la LOV, y que la administración de ésta no aportara un efecto adicional sobre la expresión génica. Esta hipótesis se sustenta también en estudios no publicados de nuestro grupo en los que se ha observado que el aumento sinérgico de la actividad del rLDL al tratar linfocitos primarios humanos (no proliferantes) con cualquiera de los SERM más LOV es escaso comparado con el obtenido al tratar células MOLT-4 (proliferantes).

Por otra parte, el estudio del efecto de los SERM sobre los macrófagos THP-1 expuestos a distintos tipos de LDL mostró que los genes diana de SREBP aumentan su expresión tanto en presencia de LDL como de LDL-Ac, mientras que en presencia de LDL-Ox dichos genes apenas modifican su expresión. Esto último se correspondió con un limitado efecto represor de las LDL-Ox sobre las dianas de SREBP, lo que podría deberse al hecho de que la degradación de las LDL-Ox en los lisosomas es más lenta que la de las otras LDL, con lo que las primeras se acumulan en estos orgánulos [52]. En esta situación, es previsible que el efecto de los SERM sea escaso. Por otro lado, se ha descrito que los distintos tipos de LDL ya no solo se captan mediante distintos receptores sino que, además, se procesan mediante distintos endosomas/lisosomas [382]. A

pesar de ello, los efectos de los SERM en los macrófagos THP-1 expuestos a LDL o LDL-Ac son equivalentes, lo que indica que estos fármacos producen efectos similares sobre los correspondientes lisosomas.

La interferencia en el tráfico intracelular de colesterol producida por los SERM también repercutió en la regulación de la expresión de genes diana de LXR, asimismo relevantes en el mantenimiento de la homeostasis celular del colesterol [249, 274]. Sin embargo, el efecto sobre estos genes no fue general, tal y como se observó con macrófagos THP-1 (**Fig. 14, 16, 17 y 24**) y, a demás, fue más variable entre distintas líneas celulares que en el caso de las dianas de SREBP (**Fig. 14, 16, 17 y 23**), todo lo cual pudiera reflejar una regulación de la expresión de aquellos genes más compleja. En términos generales, no obstante, los resultados indican que los SERM reducen la expresión de ABCA1 y ABCG1, efecto que en los macrófagos THP-1 es más patente en presencia de LDL modificadas, tanto acetiladas como oxidadas, que de LDL nativas, probablemente porque los macrófagos captan a aquéllas más eficientemente que a éstas [317, 319]. Resulta curioso que el TAM reduzca la expresión de ABCA1 y ABCG1 también en presencia de LDL-Ox, mientras que en estas condiciones aquel apenas es efectivo sobre las dianas de SREBP (**Fig. 23**). Cabe la posibilidad de que las LDL-Ox contengan determinado oxiesteroles activador de LXR y que, a pesar de la lenta degradación lisosomal de las LDL-Ox, la salida de una pequeña cantidad de ese oxiesteroles del lisosoma sea suficiente para activar a LXR. Esa exportación sería suprimida por el TAM.

La causa fundamental de la disminución de la expresión de ABCA1 y ABCG1 puede ser una menor activación de LXR como consecuencia de la dificultad del colesterol lipoproteico para salir de los ET/L y, así, formar oxiesteroles. Cuando aumenta el contenido de colesterol celular, parte de este se utiliza en la generación de oxiesteroles, como el 27-hidroxicolesterol (en las mitocondrias) y el 25-hidroxicolesterol (en el RE y aparato de Golgi), que se unen a LXR para activar la transcripción de genes implicados en la exportación de colesterol, principalmente ABCA1 y ABCG1 [317]. Nuestros resultados estarían de acuerdo con los descritos por otros autores, quienes observaron que los mutantes para NPC1 o NPC2 no responden a la adición de LDL promoviendo la actividad de LXR, defecto que atribuyeron a la interferencia en la generación de dichos oxiesteroles detectada en esas células [148, 392]. Por otro lado, no podemos descartar la contribución de miR-33 a la menor expresión de ABCA1, diana de ese miRNA. La disminución de la cantidad de mRNA de ABCA1 coincidió con un incremento leve en la cantidad de mRNA de SREBF2 (**Fig. 23**), gen este que contiene en su secuencia al miR-33, por lo que ambos se transcriben simultáneamente [182]. En células humanas, este miRNA tiene como diana al mRNA de ABCA1, pero no al de ABCG1 [182, 312], cuyos cambios de expresión génica y proteica (ver más abajo) en los macrófagos por efecto de los SERM fueron similares a los de ABCA1. Este hecho, junto con el limitado aumento de SREBF2, sugiere que la implicación de miR-33 en la inhibición de la expresión de ABCA1 por los SERM fue, en todo caso, discreta.

Según lo expuesto, los resultados del presente trabajo son compatibles con la idea de que los SERM inhiben la expresión de las dianas de LXR mediante la interferencia en el tráfico endosomal del colesterol procedente de las distintas LDL. Pero, curiosamente, el tratamiento de las células MOLT-4 con los SERM también disminuyó la expresión de ABCA1 cuando, en lugar de LDL, se suministró ColMCD como fuente de colesterol exógeno (**Fig. 14**), lo que sugiere que esos fármacos también pueden producir efectos independientes del tráfico endosomal. Una posible

explicación de este fenómeno podría radicar en la unión de los SERM al AEBS. Este es un complejo heterooligomérico microsomal compuesto por la 3 β -hidroxiesterol- Δ 8- Δ 7-isomerasa y la 3 β -hidroxiesterol- Δ 7-reductasa, ambas enzimas de la biosíntesis de colesterol, y al cual se unen diferentes moléculas, incluyendo algunos SERM [331, 333, 393, 394]. El complejo AEBS tiene, además, actividad 5,6-epoxicoolesterol hidrolasa, catalizando la conversión de los diastereoisómeros del 5,6-epoxicoolesterol en colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol [394, 395]. Mediante la inhibición de AEBS, TAM y RAL inducen la acumulación de dichos sustratos [395], de los cuales se ha descrito que el 5 α ,6 α -epoxicoolesterol es ligando de LXR, actuando como agonista o antagonista según el contexto celular y genético [396]. Así, se ha mostrado que este oxiesteroles es antagonista para la expresión génica de ABCA1 en queratinocitos primarios de ratón, mientras que en macrófagos THP-1 tiene una débil acción agonista [396]. Por lo tanto, en las células MOLT-4 - pero no en los macrófagos THP-1 - expuestas a colesterol exógeno los SERM pudieran oponerse a la estimulación de la expresión de ABCA1 mediante la acumulación de 5 α ,6 α -epoxicoolesterol. Este efecto podría tener lugar *in vitro* incluso al suministrar a las células colesterol no lipoproteico. Hipotetizamos, por tanto, que los SERM disminuyen la activación de LXR mediante la reducción de la disponibilidad de colesterol exógeno para la formación de oxiesteroles activadores, y, en aquellas células con una alta tasa de biosíntesis de colesterol, mediante la generación de 5 α ,6 α -epoxicoolesterol.

Los SERM, así como determinados derivados metabólicos suyos, son capaces de unirse a los ER y, de hecho, se conoce que sus efectos terapéuticos primarios derivan de las interacciones con estos receptores [324]. Por ello, nos preguntamos si los ER podían estar implicados en los efectos de los SERM. Observamos que ninguna de las líneas celulares utilizadas expresó cantidades apreciables del ESR1, y solo en la línea MOLT-4 se detectó una muy pequeña cantidad del mRNA de ESR2. Además, en dichas líneas celulares la adición de E2 no estimuló la expresión de los genes diana de los ER. La adición de ICI, inhibidor de los ER que induce la degradación de los mismos [342], no modificó el efecto de los SERM sobre la expresión génica. Por último, la adición de ICI no alteró el efecto de los SERM sobre el tráfico intracelular de colesterol en los MPR ni, por otro lado, el E2 tuvo efecto sobre este tráfico. En su conjunto, estos resultados nos permiten descartar la implicación de los ER en los efectos de los SERM descritos en este trabajo.

Los efectos de los SERM sobre el tráfico intracelular de colesterol y, consiguientemente, la regulación mediada por los SREBP y la esterificación de colesterol, son comunes a un conjunto de moléculas que, como el TAM, RAL y TOR, son compuestos anfifílicos catiónicos (la carga se debe a su grupo amino). El más conocido de ellos y uno de los primeros para el que se describió esta propiedad es el U18666A [397]. Otros compuestos con características químicas semejantes y los cuales causan la acumulación de colesterol en los ET/L son el clomifeno, Ro 48-8071, terconazol y triparanol. Se ha descrito que la capacidad de estos compuestos y el U18666A para interferir en el tráfico endosomal está implicada en la inhibición de la infección de las células por el virus del Ébola [398]. Es posible que estos compuestos afecten especialmente al funcionamiento de NPC1, implicada en el transporte lisosomal de colesterol, ya que en células que sobreexpresan NPC1 se necesitan dosis mayores de aquellos agentes para lograr el mismo grado de inhibición de la infección que en células control [398]. En nuestro caso, la inhibición del tráfico no parece deberse a una disminución de la expresión de NPC1 o NPC2, como

comprobamos en las células MOLT-4 y HepG2 (**Fig. 18 y 19**), aunque no podemos descartar una inhibición de la actividad de estas proteínas lisosomales. También los antipsicóticos como el haloperidol, la clozapina, la risperidona y la ziprasidona son aminas anfifílicas que inhiben el tráfico intracelular de colesterol y aumentan la expresión de genes diana de SREBP [380, 399, 400]. Estos efectos son típicos de moléculas lisosomotrópicas, es decir que se acumulan en los lisosomas. El mecanismo fundamental de entrada de estas moléculas en el lisosoma es la difusión pasiva [401]. La parte lipofílica presente en sus estructuras permite que atraviesen la membrana lisosomal cuando la molécula está en su forma básica no ionizada, lo cual se ve favorecido por el gradiente de concentración [402]. Al pasar de un pH cercano a la neutralidad en el citoplasma a un pH ácido en el lisosoma la base se ioniza y no puede salir de este compartimento. Además, esto favorece el gradiente de concentración de la molécula neutra para que ésta difunda al interior del lisosoma, hasta que la concentración de la amina llega a ser varios órdenes de magnitud mayor en este compartimento que en el citoplasma. A este proceso se le llama partición por pH o atrapamiento de iones [401].

La acumulación intracelular del colesterol lipoproteico producida por los SERM es semejante a la que ocurre en la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C [403]. Esta es una enfermedad neurodegenerativa asociada a la acumulación de colesterol en el hígado, bazo y cerebro [131, 404]. ¿Se podrían reproducir, entonces, los síntomas de esta enfermedad en los pacientes que toman SERM? Según las evidencias de las que se dispone no, aunque no se puede descartar la aparición de estos efectos si el tratamiento con SERM se prolonga por mucho tiempo. Por supuesto, la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, al ser genética, está presente y afecta a etapas cruciales del desarrollo embrionario y el crecimiento, mientras que los SERM se suelen suministrar a individuos adultos, en los que el cerebro ya está completamente formado, por lo que son esperables, en su caso, efectos más leves. Además, debemos tener en cuenta que una inhibición farmacológica de un transportador suele ser menos severa que una deficiencia genética del mismo.

En resumen, el TAM, RAL y TOR inhiben el tráfico intracelular del colesterol captado con las LDL y, consecuentemente, influyen en los mecanismos de regulación de la homeostasis celular del colesterol. Entre éstos destaca la vía de los SREBP, sobre la cual los SERM ejercen un efecto estimulador y, a su vez, sinérgico con el de la LOV. Además, los SERM tienen la capacidad de inhibir la expresión de ABCA1 y ABCG1. El mecanismo molecular implicado en estas acciones de los SERM es independiente de los ER y probablemente esté relacionado con su característica de ser aminas anfifílicas.

2. Efecto de los SERM sobre la exportación de colesterol por el macrófago

La interferencia causada por los SERM en la disponibilidad del colesterol lipoproteico y la inhibición en la expresión génica de ABCA1 y ABCG1 planteaba la posibilidad de que dichos fármacos alteraran la exportación celular del colesterol. Este proceso, además de esencial para la homeostasis celular de colesterol, constituye el paso inicial del TRC y se considera clave para impedir la acumulación de este lípido en los macrófagos de la íntima arterial, implicada en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. LXR desempeña un papel esencial en la regulación de la exportación celular de colesterol cuando aumenta el contenido en este lípido [274]. Así, como se ha comentado anteriormente, a partir del colesterol se generan 27-hidroxicolesterol y 25-hidroxicolesterol, que se unen a LXR para activar la transcripción de genes implicados en la exportación de colesterol, principalmente ABCA1 y ABCG1, los cuales, en la MP, ceden colesterol a apo A-I y HDL respectivamente [148]. De este modo, la dificultad del colesterol lipoproteico para salir de los ET/L por efecto de los SERM no solo mermaría su llegada a la MP sino también la activación de la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1. Nosotros hipotetizamos que, en esta situación, la exportación de colesterol por el macrófago sería deficiente.

En primer lugar, pudimos constatar que la disminución en la expresión génica de ABCA1 y ABCG1 por los SERM se traducía en una notable disminución de la cantidad de proteína de estos transportadores en macrófagos humanos cargados con colesterol mediante su exposición a LDL-Ac. Así pues, a la interrupción del tráfico intracelular de colesterol por los SERM se suma una menor expresión de las moléculas exportadoras del mismo. De manera coherente con estos resultados, cuando trazamos la exportación del colesterol captado con las LDL-Ac (suministrando LDL-Ac-[³H]colesterol), los SERM disminuyeron la exportación de colesterol hacia apo A-I o HDL, tanto en macrófagos humanos como de ratón. Cuando, por otro lado, marcamos los macrófagos THP-1 con [³H]colesterol disuelto previamente en etanol, evitando así la acumulación del trazador en los ET/L e incorporándolo principalmente a la MP, el TAM también redujo la exportación, lo cual indica que la sola inhibición de la expresión de ABCA1 y ABCG1 por ese fármaco altera la exportación de colesterol por el macrófago. La disminución de la exportación producida por los SERM fue en todos los casos más pronunciada cuando se utilizó como aceptor apo A-I que cuando se trató de HDL, lo que sugiere que la cesión del colesterol del macrófago al aceptor más temprano, la cual genera HDL nacientes y está mediada por ABCA1 [54], es el paso más alterado por aquellos fármacos.

El hecho de que los SERM resultaran ser menos eficientes disminuyendo la exportación de [³H]colesterol hacia HDL que hacia apo A-I sugiere un efecto diferencial sobre la exportación mediada por ABCG1 y ABCA1, respectivamente. Ello no se corresponde con los efectos sobre las expresiones de ambos transportadores, que fueron similares entre sí. El distinto grado de inhibición en función del aceptor de colesterol pudiera estar relacionado con el aumento de expresión de SR-BI por efecto de los SERM. Este transportador también puede ceder colesterol a las HDL [102, 103] y, de esta manera, compensaría en parte la disminución de la exportación mediada por ABCG1.

Curiosamente, la exportación basal neta de [3 H]colesterol hacia apo A-I por los MPH en las mismas condiciones empleadas con los macrófagos THP-1 y MPR resultó ser prácticamente nula (**Fig.38**). De hecho, para poder observar los efectos de los SERM, fue necesario añadir simultáneamente LDL-Ac al medio que contenía los aceptores específicos. De acuerdo con lo publicado por otros autores para las LDL [384, 385], las LDL-Ac podrían actuar como reservorio del colesterol celular cedido en primera instancia a los aceptores específicos, que estos cederían luego a las LDL/LDL-Ac, creando así un gradiente favorable para la exportación celular de colesterol. Según nuestras observaciones, este proceso parece ser especialmente relevante cuando las células presentan una baja tasa de exportación de colesterol *in vitro*.

Nuestros resultados indican que la exportación del colesterol desde los ET/L es un determinante crítico de la expresión y actividad exportadora de ABCA1 en el macrófago. Esto está en consonancia con estudios realizados utilizando fibroblastos de pacientes con patologías como la de Niemann-Pick de tipo C [405] y enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD), causada por la deficiencia de la lipasa ácida lisosomal [392], en las cuales se acumulan, respectivamente, colesterol libre y colesterol esterificado en los lisosomas. Dichos fibroblastos no son capaces de incrementar la expresión de ABCA1 en respuesta a las LDL y ceden ineficientemente colesterol a la apo A-I [405].

La adición de T0 a los macrófagos para activar LXR aumentó notablemente, como cabía esperar, la cantidad de proteína de los transportadores ABCA1 y ABCG1 respecto a la condición control. Ello se asoció, en general, a un aumento más bien moderado de la salida de [3 H]colesterol desde las células no tratadas con SERM, posiblemente debido a que no todas las moléculas de los transportadores se hallaban en la localización celular en la que son funcionales. Los SERM apenas alteraron dichos incrementos de expresión de ABCA1 y ABCG1, pero siguieron inhibiendo la exportación del [3 H]colesterol suministrado con las LDL-Ac. Esto indica que los SERM también alteran la exportación de colesterol en condiciones de elevada expresión de los transportadores, lo que es coherente con el papel limitante que tiene la salida del colesterol del ET/L. Rigamonti et ál. obtuvieron unos resultados similares en sus estudios con MPH, en los que observaron que la inhibición del tráfico endosomal de colesterol con progesterona inhibe la exportación de colesterol hacia apo A-I y abroga el efecto estimulador de T0 sobre este proceso [406].

No obstante lo dicho, es interesante señalar que la activación de LXR con T0 consiguió regularmente reducir el grado de inhibición de la exportación de colesterol causada por los SERM (**Fig. 30, 31 y 40**). Este efecto de T0 puede ser debido a una mayor eficiencia de la exportación del colesterol disponible gracias a la mayor presencia de moléculas transportadoras en la MP. Sin embargo, tal efecto también es compatible con la implicación directa de ABCA1 en la extracción y transporte a la membrana del colesterol desde los ET/L, tal y como propusieron Boadu et ál. [407] a raíz de sus trabajos con fibroblastos humanos deficientes en NPC1. Estos autores observaron que el tratamiento de dichas células con T0 aumenta la expresión de ABCA1 y ABCG1 y la cesión de colesterol celular a la apo A-I, a la vez que reduce la cantidad de colesterol libre en ET/L. También es coherente con los hallazgos de Neufeld et ál. [168], quienes propusieron que ABCA1 puede mediar el tráfico vesicular intracelular de apo A-I exógena y la posterior asociación de ésta con colesterol y fosfolípidos de ET/L, tras lo cual el complejo lipoproteico formado viaja a la superficie celular y es secretado como una HDL naciente.

Por otra parte, no observamos efecto sinérgico sobre la exportación de colesterol por los macrófagos THP-1 cuando se combinó cualquiera de los SERM con LOV. Creemos que, al igual que lo propuesto para explicar la falta de efecto sinérgico sobre la expresión génica, la baja tasa de biosíntesis del colesterol de los macrófagos los hace poco sensibles a la LOV, por lo que este fármaco no incrementa la inhibición de la exportación de colesterol más allá de lo que hacen los SERM.

A diferencia de lo que ocurrió con los SERM, el tratamiento de los macrófagos THP-1 y los MPR con E2 no produjo ningún efecto sobre la exportación de [^3H]colesterol. Además, el ICI no impidió la disminución de la exportación de [^3H]colesterol producida por los SERM. Estos resultados no se corresponden con los de Napolitano et ál. en el que demostraron que la exportación de colesterol desde MPH es más activa cuando estos se diferencian en presencia de E2 [408]. También difieren de los datos de otro estudio en el que observaron que el E2 asociado a las HDL estimula la exportación de colesterol desde los MPH, a lo que los autores atribuyeron parte de los efectos cardiovasculares beneficiosos de los estrógenos [409]. De cualquier forma, nuestros resultados indican que los ER no están implicados en la inhibición de la exportación del colesterol ejercida por los SERM, lo que está en consonancia con la falta de efecto de estos receptores sobre el tráfico intracelular de colesterol.

Por tanto, el TAM, RAL y TOR disminuyen la exportación del colesterol del macrófago hacia las HDL y, en mayor medida, hacia la apo A-I, efectos atribuibles tanto a la inhibición de la salida del colesterol de los ET/L como a la reducción de la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1 mediante la interferencia en la activación de LXR. Este efecto es independiente de los ER, lo cual, junto a los hallazgos discutidos en el apartado anterior, indica que estos receptores no están implicados en las acciones de los SERM sobre la homeostasis celular del colesterol descritas en el presente estudio.

3. Efecto del tamoxifeno y el raloxifeno sobre el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos

El hecho de que los SERM disminuyeran la exportación de colesterol tanto en macrófagos humanos como en macrófagos de ratón nos sugirió la posibilidad de que el TRC desde dichas células pudiera estar afectado en individuos tratados con uno de los SERM. Este proceso consiste en el transporte del colesterol desde los macrófagos hasta el hígado para su excreción fecal, y se considera relevante para prevenir el desarrollo de aterosclerosis [54]. Dicha cuestión la abordamos en ratones tratados con TAM, RAL o vehículo y a los cuales inyectamos intraperitonealmente macrófagos expuestos a esos mismos agentes, respectivamente, y conteniendo [^3H]colesterol para trazar el transporte del colesterol macrófágico. Los resultados obtenidos demuestran que, si bien el TAM y el RAL disminuyen la concentración de colesterol-HDL, solo el TAM disminuye el TRC desde los macrófagos.

El análisis de los lípidos séricos reveló que el TAM y el RAL disminuyen la concentración sérica de colesterol, efecto en el que el TAM resultó ser algo más potente que el RAL. Sin embargo, estos SERM no tenían efectos significativos sobre los lípidos hepáticos. El efecto sobre la concentración sérica de colesterol es atribuible prácticamente por completo a la disminución

de la concentración de colesterol-HDL. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores en ratones tratados con TAM [329, 410] y en ratas tratadas con el también SERM acolbifeno [411], mientras que, hasta donde nosotros conocemos, no existen estudios lipídicos en estos animales tratados con RAL. Es preciso señalar que en humanos tratados con TAM o RAL no suelen alterarse las concentraciones de colesterol-HDL, sino que el efecto más regular es la reducción de la concentración de colesterol-LDL [322, 327, 328, 348, 349]. No obstante, un estudio en hombres tratados con TAM encontró una disminución significativa de la concentración de colesterol-HDL asociada a una disminución en los triglicéridos plasmáticos [412]. Los estudios publicados acerca del tratamiento de ratones con SERM indican que el efecto sobre la concentración de colesterol-LDL es dispar en función del modelo utilizado. Así, en ratones normales, en los cuales las LDL son una fracción minoritaria, el TAM apenas altera dicha concentración [329], coincidiendo con nuestros resultados. Sin embargo, en ratones *Apoe^{-/-}*, en los cuales las VLDL y LDL son las fracciones predominantes, el TAM reduce significativamente las concentraciones de colesterol en las mismas [410]. Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento de ratas con acolbifeno reduce la concentración de colesterol-LDL a la vez que aumenta la expresión hepática del rLDL [411]. Sin embargo, otros autores no han observado estos cambios en ratas tratadas con TAM o clomifeno [413]. En el presente estudio no hemos observado una alteración de la expresión del rLDL en el hígado por efecto del TAM o el RAL, lo que está en consonancia con la falta de efecto sobre la concentración de colesterol-LDL.

La disminución del colesterol-HDL puede explicarse por el aumento del catabolismo de dichas lipoproteínas. Así, hemos demostrado que el tratamiento con TAM o RAL acelera la desaparición de las HDL marcadas con oleato de [³H]colesterol e inyectadas intravenosamente, aunque solo el TAM tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la tasa catabólica fraccional. Este incremento coincidió en ambos tratamientos con un aumento de la expresión hepática de proteína SR-BI, transportador fundamental en la captación del colesterol de las HDL en el ratón y cuya expresión favorece el TRC desde los macrófagos [227]. El aumento de SR-BI hepático también se ha observado tras el tratamiento de ratas con acolbifeno [411]. Por otro lado, es pertinente señalar que la expresión hepática de ABCA1 es un determinante principal de la biosíntesis y la concentración plasmática de HDL [54], pero la falta de efecto de los SERM sobre dicha expresión - aspecto que discutiremos más adelante - sugiere que ABCA1 no está implicado en la reducción de aquella concentración por esos fármacos. Por lo tanto, la reducción de la concentración del colesterol-HDL en los ratones tratados con los SERM puede ser consecuencia del aumento en la velocidad de captación del colesterol de dichas partículas mediada por SR-BI hepático. No podemos descartar que, además del aumento de la expresión hepática de SR-BI, la alterada composición de las HDL como consecuencia del tratamiento con estos SERM pueda contribuir al acelerado catabolismo de esas lipoproteínas.

El tratamiento con TAM mostró una tendencia al aumento de la concentración sérica de triglicéridos respecto a los animales control, lo que se correspondió con una elevación de estos lípidos en la fracción de VLDL (**Fig. 45 y 46**). Este hecho, que recuerda al descrito en algunos humanos tratados con TAM [341, 390] pudiera deberse, al menos en parte, a un incremento en la biosíntesis hepática de triglicéridos por aumento de la expresión de las enzimas implicadas, aumento que podría estar mediado por la interferencia en el tráfico intracelular de colesterol, como ya hemos comentado anteriormente.

Pasando al estudio del TRC desde los macrófagos inyectados intraperitonealmente, observamos que el tratamiento con TAM, a diferencia del tratamiento con RAL, disminuyó la cantidad de trazador en el suero e hígado a las 48 h y la cantidad total acumulada en las heces. La menor cantidad de trazador en el suero de los ratones tratados con TAM fue debida prácticamente por completo a la reducción de la cantidad presente en las HDL. Este efecto puede estar condicionado por el acelerado catabolismo de las HDL y, por otra parte, también es compatible con una menor transferencia de [3 H]colesterol de los macrófagos peritoneales hacia el suero, proceso mediado principalmente por las HDL. El hecho de que el hígado de los animales que recibieron TAM tuviese menor cantidad de trazador aún existiendo una menor excreción del mismo en las heces, sugiere que el hígado de esos ratones tiene un menor aporte del colesterol procedente de los macrófagos que el hígado de los animales tratados con RAL o vehículo. Esto sucedería a pesar de la mayor tasa catabólica de las HDL por efecto del TAM, dado que la propia disponibilidad del colesterol de los macrófagos estaría restringida. Sin duda, el menor aporte de este colesterol al hígado puede ser importante para determinar la menor excreción fecal que observamos en los ratones tratados con TAM. De hecho, en los ratones a los que inyectamos intravenosamente las HDL marcadas con oleato de [3 H]colesterol, y en los que la exportación de colesterol por los macrófagos no influye en las cuantificaciones del trazador, desaparecieron las diferencias en la cantidad total de trazador ([3 H]colesterol libre y esterificado) en el hígado, a la vez que se mitigó la disminución de [3 H]colesterol en las heces por efecto del TAM (**Fig. 47 y 50**). Es pertinente hacer notar, por otra parte, que las HDL constituyen una población de partículas altamente heterogéneas en cuanto a sus características fisicoquímicas y metabólicas, por lo que el catabolismo de las HDL aisladas del plasma para marcarlas, que representan mayoritariamente HDL maduras, puede no ser fiel reflejo del catabolismo de las HDL que transportan el colesterol previamente extraído del macrófago. Así, parte de estas HDL podrían entrar en la circulación sanguínea como partículas inmaduras (de pequeño tamaño o pre β), las cuales son minoritarias en el plasma [55]. En definitiva, la reducción de la cantidad de trazador en el suero y el hígado de los ratones tratados con TAM puede ser consecuencia de una menor transferencia del colesterol desde los macrófagos al suero.

Aunque no conocemos los factores que condicionan esta transferencia, el proceso de la cesión del colesterol de los macrófagos a los aceptores extracelulares es, previsiblemente, crítico. Un papel importante de la exportación del colesterol del macrófago en el TRC en el ratón también se ha puesto de manifiesto en estudios anteriores [209, 414]. En el fluido de la cavidad peritoneal de los ratones se han detectado α -HDL y, principalmente, pre β -HDL [382]. La menor cantidad de trazador por unidad de masa de colesterol que encontramos en las HDL de los animales tratados con TAM es compatible con una menor eficiencia de la transferencia del colesterol del macrófago a esas HDL. Una posible causa de esto podría ser que, *in vivo*, la capacidad de los propios macrófagos para exportar colesterol fuera menor en los ratones tratados con TAM que en los tratados con RAL o con vehículo. Esto, en cualquier caso, no se correspondería con los resultados obtenidos *in vitro*, en los que el tratamiento de los macrófagos con ambos SERM produjo una disminución similar de la exportación de [3 H]colesterol. Otro factor que puede influir en este proceso de exportación, y en el metabolismo de las HDL en general, es la calidad de estas partículas [156, 158]. Si bien las HDL plasmáticas no son equivalentes a las presentes en el fluido peritoneal [382], analizamos, como aproximación, la composición y capacidad de aquellas partículas para aceptar colesterol del

macrófago. Pudimos comprobar que el TAM modifica la composición de las HDL a la vez que disminuye la capacidad de éstas y la del plasma para captar el colesterol cedido por las células. Debemos tener en cuenta, por otro lado, que los ensayos de exportación de colesterol hacia las HDL se realizaron añadiendo la misma cantidad de HDL en todas las condiciones, mientras que la concentración de las mismas en los plasmas de los animales tratados con TAM fue menor que en los de los controles, lo cual también puede contribuir a la menor capacidad de aquellos plasmas para captar colesterol de los macrófagos. Por su parte, el RAL modificó en menor grado que el TAM la composición y capacidad aceptora de colesterol de las HDL, lo que se correspondió con un leve efecto en la cantidad de [^3H]colesterol en el plasma respecto al grupo control. Así pues, para explicar la menor eficiencia de la transferencia del colesterol de los macrófagos al plasma en los ratones tratados con TAM que en los controles y los tratados con RAL podemos proponer la menor capacidad de las HDL para captar el colesterol de los macrófagos y la menor concentración de estas partículas, sin descartar una menor capacidad de los macrófagos para exportar colesterol *in vivo*.

Aunque la diferencia en la excreción fecal de [^3H]colesterol entre los ratones tratados con TAM y los otros grupos disminuyó cuando se inyectaron las HDL marcadas, esta no se suprimió por completo, lo que indica que este fármaco altera otros factores implicados en dicha excreción. Los transportadores ABCG5 y ABCG8, tienen un papel clave en la excreción del colesterol a la bilis, el cual pasará, posteriormente, a las heces [415]. En nuestro estudio hemos observado que el TAM, pero no el RAL, disminuye la cantidad de los mRNA de ABCG5 y ABCG8 en el hígado de los ratones. En cambio, la expresión de las proteínas ABCG5 y ABCG8 disminuyó por efecto del TAM y también del RAL, aunque, aparentemente, en menor proporción con éste que con el primero. Desconocemos la causa de la disparidad en la expresión del mRNA y la proteína de ABCG5 y ABCG8 hepáticos en los ratones tratados con RAL, pero podría ser indicativo de un efecto menos potente o duradero de este fármaco comparado con el TAM. Los mencionados transportadores, que son dianas de LXR, son esenciales para la estimulación del TRC desde los macrófagos en ratones tratados con los activadores sintéticos de LXR TO [233] y GW3965 [416]. Es posible, entonces, que la interferencia en el tráfico intracelular de colesterol y, por tanto, en la activación de LXR por los SERM, que en los macrófagos resultaba en la inhibición de la expresión de ABCA1 y ABCG1, también tenga lugar en el hígado de los ratones, aunque esta vez para disminuir la expresión de ABCG5 y ABCG8. Un dato que apoya esta hipótesis es que los hígados de los ratones tratados con TAM o RAL y a los que se les habían inyectado macrófagos con [^3H]colesterol contenían una menor cantidad de [^3H]colesterol esterificado que los ratones control (**Fig. 47**), lo que es compatible con una menor disponibilidad de ese colesterol para la ACAT-1.

Al contrario de lo que sucedió con la expresión de ABCG5 y ABCG8, en el presente estudio no hemos observado cambios en la expresión de ABCA1 y ABCG1 en los hígados de los ratones tratados con SERM, lo que es compatible con una falta de efecto sobre la síntesis hepática de HDL. Ello contrasta con la marcada disminución de la expresión de dichos transportadores que produjeron los SERM en los macrófagos *in vitro*. Nuestros resultados guardan cierta similitud con los de un estudio realizado con células de ratones *Npc1*^{-/-} [313]. Los autores del mismo reportaron que la expresión de ABCA1 y la exportación de colesterol hacia apo A-I por los macrófagos *Npc1*^{-/-} están disminuidas respecto a los macrófagos normales, mientras que, por el

contrario, en los hepatocitos *Npc1*^{-/-} ambos parámetros están aumentados respecto a los hepatocitos normales [313]. La regulación de la expresión génica de *Abca1* en el hígado es más compleja que en los macrófagos. En el caso del gen de *ABCA1*, se han descrito dos productos de transcripción correspondientes a la actividad de dos promotores distintos [417]. Uno de los promotores está situado en la región 5' respecto al exón 1, contiene un elemento LXRE y es especialmente activo en las células periféricas, por lo que genera el llamado producto de transcripción periférico. El otro promotor está situado en el intrón 1, contiene un elemento SRE y es activo en el hígado, generando el llamado producto de transcripción hepático. En el hígado, la expresión de *ABCA1* está regulada tanto por LXR como por SREBP-2, mientras que en los tejidos periféricos solo se expresa el producto de transcripción periférico, controlado por LXR [417]. Estas peculiaridades pueden estar implicadas en el hecho de que la expresión hepática de *Abca1* sea menos sensible a los activadores de LXR que las células periféricas [416, 418]. Por otro lado, explican el efecto de las estatinas, las cuales incrementan dicha expresión hepática mediante la activación del elemento SRE del segundo promotor [417]. Estos hallazgos sugieren que la regulación de la expresión de *ABCA1* en el hígado, y posiblemente también de *ABCG1*, en respuesta a cambios en el contenido o la disponibilidad celular de colesterol no es simple, ya que, distintamente a lo que sucede en los macrófagos, aquella expresión puede ser estimulada por factores de transcripción que se activan en situaciones contrapuestas.

Como hemos indicado anteriormente, los SERM no modificaron la expresión hepática del rLDL. Cabe preguntarse si esto podría deberse a la falta de efecto significativo sobre el tráfico intracelular del colesterol captado por el hígado. Debe tenerse en cuenta que en el ratón las HDL, más abundantes que las LDL, aportan una gran proporción de colesterol al hígado mediante SR-BI, proceso este que es selectivo y no implica la captación y degradación de la partícula, es decir, es independiente de la vía endosomal. La captación del colesterol de las HDL mediante SR-BI parece verse favorecida en los animales tratados con los SERM, con lo que estos fármacos tendrían poca repercusión sobre el tráfico intracelular de colesterol y no activarían la expresión del rLDL. Sin embargo, se ha descrito que, a diferencia de lo que ocurre en fibroblastos, la expresión del rLDL en los hepatocitos humanos HepG2 y primarios es poco sensible a los cambios en el contenido de colesterol, debido a que solo una pequeña parte de este se destina al *pool* regulador [419, 420]. Un trabajo reciente con hepatocitos de hámster ha descrito que el colesterol de las LDL captadas por los hepatocitos se distingue del captado con otras lipoproteínas porque aquel se utiliza preferentemente para la síntesis de VLDL y apenas ejerce acciones reguladoras sobre la biosíntesis de colesterol y la expresión del rLDL [421]. Con estos antecedentes, no podemos descartar que en los hígados de nuestros ratones tratados con SERM exista una inhibición del tráfico intracelular de colesterol a la que no sería sensible la expresión del rLDL, aunque sí pudiera serlo la de otras moléculas, como *ABCG5* y *ABCG8*.

En general, los SERM redujeron la expresión génica de las proteínas ABC, dianas de LXR, en el duodeno y el íleon. El RAL resultó ser el más eficiente disminuyendo la expresión de *ABCG5* y *ABCG8*, lo que sugiere que disminuiría la excreción de esteroides. Se ha descrito que la expresión de estos transportadores en el duodeno no es determinante para la excreción del colesterol absorbido en el intestino, mientras que sí lo son el yeyuno y el íleon [422]. En el íleon, RAL también disminuyó la expresión génica de *Npc1l1*, implicado en la absorción de colesterol, lo que podría compensar en parte una posible disminución de la excreción debida a la menor

expresión de ABCG5 y ABCG8 producida por este fármaco. Por lo tanto, es posible que los efectos de los SERM en el intestino no tengan un impacto importante en el TRC. En relación con este órgano, es preciso señalar que en el presente estudio no hemos abordado el efecto de los SERM sobre el transporte transintestinal de colesterol, proceso que permite la excreción de este lípido independiente del hígado [234-236].

Es probable que al menos alguno de los efectos de los SERM *in vivo* impliquen a los ER, pero es difícil precisarlo. Se ha descrito que el tratamiento de ratones con E2 reduce las concentraciones de HDL [423], efecto común al producido por los SERM. Sin embargo, en ese mismo estudio se observó una disminución de la cantidad del mRNA de ABCA1 en hígado, no observada en el presente estudio, e intestino [423], que sí coincide con el efecto del TAM en duodeno e íleon. Por otro lado, el efecto hipocolesterolemizante de E2 en roedores se ha atribuido al aumento de la expresión hepática del rLDL [413]. Al contrario que este receptor, la expresión de SR-BI en el hígado disminuye considerablemente en las ratas tratadas con dicha hormona [424]. Estos efectos sobre rLDL y SR-BI no coinciden con los encontrados en nuestro estudio. En cuanto a ABCG5 y ABCG8, se ha descrito que no están regulados por los estrógenos [425]. En conjunto, estos resultados sugieren que al menos parte de los efectos de los SERM que nosotros hemos observado *in vivo* son independientes de los ER y dejan abierta la posibilidad de que algunos de ellos sean consecuencia de una interferencia en la disponibilidad celular de colesterol.

Cabe preguntarse por las implicaciones fisiopatológicas de estos hallazgos. Se considera que el TRC desde los macrófagos constituye un mecanismo protector frente al desarrollo de aterosclerosis. Los estudios realizados en ratones han permitido documentar que el desarrollo de aterosclerosis se correlaciona mejor con la eficiencia del TRC que con la concentración de HDL [156, 216]. En nuestro modelo, el TAM tendría, por tanto, implicaciones negativas para el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Sin embargo, el grupo de Grainger ha descrito que el tratamiento de ratones con TAM reduce la formación de placas de ateroma [329, 410]. Estos efectos se han atribuido, al menos en parte, al aumento de la producción de TGF- β por los macrófagos de la íntima arterial. El efecto de los SERM sobre el TRC desde los macrófagos no se había analizado hasta el presente estudio. La extrapolación de estos resultados a humanos no es sencilla, dado su distinto perfil lipoproteico y ciertas diferencias metabólicas, como la relacionada con la actividad de CETP, ausente en el ratón [59]. El hecho de que en los pacientes tratados con SERM no suela alterarse la concentración de colesterol-HDL no implica que el TRC desde los macrófagos no se vea afectado, ya que este parámetro no tiene por qué ser estrictamente dependiente de dicha concentración, como aquí hemos observado en el caso del ratón. El efecto de los SERM sobre el riesgo de aterosclerosis en humanos es objeto de debate, pero no parecen aumentarlo [330, 426]. Aunque no conocemos la repercusión de estos fármacos sobre el TRC en humanos, cabe la posibilidad de que el efecto perjudicial debido a un TRC hipotéticamente menos eficiente se vea contrarrestado por efectos beneficiosos de los SERM, como puede ser la reducción de la concentración de colesterol-LDL.

En resumen, nuestros resultados demuestran que el TAM, pero no el RAL, disminuye el TRC desde los macrófagos. El efecto del TAM es atribuible a una menor exportación del colesterol del macrófago y, probablemente en menor medida, a una disminución de la expresión hepática de ABCG5 y ABCG8, pero aquel no es reflejo de los efectos del fármaco sobre la

concentración circulante y la tasa catabólica del colesterol-HDL. Por su parte, el RAL muestra efectos cualitativamente similares a los del TAM, aunque de menor intensidad, lo que sugiere que los mismos no son suficientes para contrarrestar la aceleración, en este caso más moderada, del catabolismo de las HDL.

CONCLUSIONES

1. Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno inhiben el tráfico intracelular del colesterol de las LDL, acumulándose en los endosomas tardíos/lisosomas. En los macrófagos tanto humanos como de ratón, incluyendo los primarios, los SERM también inhiben el tráfico intracelular de las LDL acetiladas.
2. El tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno aumentan el procesamiento de los SREBP y la expresión de sus genes diana. En células proliferantes, estos efectos son sinérgicos con los producidos por la lovastatina.
3. Los tres SERM disminuyen la expresión génica de las dianas de LXR y, de forma destacada, la de ABCA1 y ABCG1. En los macrófagos, este efecto es más marcado al suministrarles LDL modificadas químicamente y se traduce en una disminución de la expresión de esas proteínas.
4. El tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno disminuyen la exportación del colesterol del macrófago hacia las HDL y, especialmente, hacia la apolipoproteína A-I, lo cual se debe a la menor disponibilidad del colesterol lipoproteico para ABCG1 y ABCA1, respectivamente, así como a la inhibición de la expresión de estos transportadores.
5. Los efectos de los tres SERM sobre el tráfico intracelular del colesterol lipoproteico, la expresión de las dianas de SREBP y LXR y la exportación del colesterol son independientes de los receptores de estrógenos.
6. El tamoxifeno y el raloxifeno reducen la concentración de colesterol-HDL en ratones mediante la aceleración de su catabolismo. Este efecto es atribuible al aumento de la expresión hepática de SR-BI, aunque también puede contribuir la alteración de la composición de las HDL que causan dichos fármacos.
7. El tratamiento de los ratones con tamoxifeno y, en menor magnitud, con raloxifeno reduce la capacidad de las HDL para aceptar el colesterol de los macrófagos, efecto que se correlaciona con la alteración de la composición de estas lipoproteínas.
8. El tamoxifeno, pero no el raloxifeno, disminuye el transporte reverso de colesterol desde los macrófagos en un modelo de ratón, efecto probablemente debido a la inhibición de la salida del colesterol desde dichas células y, en menor grado, a la reducción de la excreción hepática mediada por ABCG5 y ABCG8.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lasuncion, M.A., *El colesterol: biosíntesis, acciones y alteraciones*. Alimentación, Nutrición y Salud, 2006. **13**(4): p. 97-120.
2. Kresge N., S.R.a.H.R., *The Biosynthetic Pathway for Cholesterol: Konrad Bloch*. JBC, 2005. **Vol. 280, No. 10**(March 11): p. e7.
3. Konstantinov, I.E., N. Mejevoi, and N.M. Anichkov, *Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis*. Tex Heart Inst J, 2006. **33**(4): p. 417-23.
4. Gofman, J.W. and F. Lindgren, *The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis*. Science, 1950. **111**(2877): p. 166-71.
5. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(4): p. 431-8.
6. Anderson, R.G., *Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(10): p. 534-9.
7. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S15-27.
8. Brown, M.S., J. Ye, and J.L. Goldstein, *Medicine. HDL miR-ed down by SREBP introns*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1495-6.
9. Pike, L.J., *Lipid rafts: bringing order to chaos*. J Lipid Res, 2003. **44**(4): p. 655-67.
10. Simons, K. and R. Eehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 597-603.
11. Staubach, S. and F.G. Hanisch, *Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer*. Expert Rev Proteomics, 2011. **8**(2): p. 263-77.
12. Stefani, M. and G. Liguri, *Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions*. Curr Alzheimer Res, 2009. **6**(1): p. 15-29.
13. Mauch, D.H., et al., *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1354-7.
14. Pfrieger, F.W., *Role of cholesterol in synapse formation and function*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1610**(2): p. 271-80.
15. Goritz, C., D.H. Mauch, and F.W. Pfrieger, *Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron*. Mol Cell Neurosci, 2005. **29**(2): p. 190-201.
16. Fernandez-Hernando, C., Y. Suarez, and M.A. Lasuncion, *Lovastatin-induced PC-12 cell differentiation is associated with RhoA/RhoA kinase pathway inactivation*. Mol Cell Neurosci, 2005. **29**(4): p. 591-602.
17. Beachy, P.A., et al., *Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view*. Genes Dev, 2010. **24**(18): p. 2001-12.
18. Farese, R.V., Jr. and J. Herz, *Cholesterol metabolism and embryogenesis*. Trends Genet, 1998. **14**(3): p. 115-20.
19. Martinez-Botas, J., et al., *Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1532**(3): p. 185-94.
20. Fernandez, C., et al., *Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation*. Exp Cell Res, 2004. **300**(1): p. 109-20.
21. Rothblat, G.H., et al., *Desmosterol as the major sterol in L-cell mouse fibroblasts grown in sterol-free culture medium*. Science, 1970. **169**(948): p. 880-2.
22. Rodriguez-Acebes, S., et al., *Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line*. Biochem J, 2009. **420**(2): p. 305-15.
23. Sanchez-Martin, C.C., et al., *Cholesterol starvation induces differentiation of human leukemia HL-60 cells*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3379-86.
24. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 425-30.

25. Maron, D.J., S. Fazio, and M.F. Linton, *Current perspectives on statins*. Circulation, 2000. **101**(2): p. 207-13.
26. Olsson, A.G., *Statin therapy and reductions in low-density lipoprotein cholesterol: initial clinical data on the potent new statin Rosuvastatin*. Am J Cardiol, 2001. **87**(5A): p. 33B-36B.
27. Huneeus, V.Q., M.H. Wiley, and M.D. Siperstein, *Isopentenyladenine as a mediator of mevalonate-regulated DNA replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(10): p. 5842-6.
28. Siperstein, M.D., *Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth*. J Lipid Res, 1984. **25**(13): p. 1462-8.
29. Farnsworth, C.C., M.H. Gelb, and J.A. Glomset, *Identification of geranylgeranyl-modified proteins in HeLa cells*. Science, 1990. **247**(4940): p. 320-2.
30. Casey, P.J., *Lipid modifications of G proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(2): p. 219-25.
31. Sorek, N., D. Bloch, and S. Yalovsky, *Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting*. Curr Opin Plant Biol, 2009. **12**(6): p. 714-20.
32. Schroepfer, G.J., Jr., *Sterol biosynthesis*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 585-621.
33. Schroepfer, G.J., Jr., *Sterol biosynthesis*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 555-85.
34. Byskov, A.G., et al., *Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 559-62.
35. Gondos, B., A.G. Byskov, and J.L. Hansen, *Regulation of the onset of meiosis in the developing testis*. Ann Clin Lab Sci, 1996. **26**(5): p. 421-5.
36. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 111-22.
37. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999. **142**(1): p. 1-28.
38. Russell, D.W., *Oxysterol biosynthetic enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 126-35.
39. Lund, E.G., J.M. Guileyardo, and D.W. Russell, *cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7238-43.
40. Bjorkhem, I., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation*. J Lipid Res, 1998. **39**(8): p. 1594-600.
41. Bretilon, L., et al., *Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina*. Curr Eye Res, 2007. **32**(4): p. 361-6.
42. Wong, J., C.M. Quinn, and A.J. Brown, *Synthesis of the oxysterol, 24(S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol*. Lipids Health Dis, 2007. **6**: p. 10.
43. Lehmann, J.M., et al., *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3137-40.
44. Janowski, B.A., et al., *Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 266-71.
45. Lasuncion, M.A., *Lipoproteínas: características, clasificación y proteínas que intervienen en su metabolismo*. Medicina Cardiovascular. Arteriosclerosis, 2005. **1**.
46. Gómez-Coronado, D., *Metabolismo de las lipoproteínas y su regulación*. Medicina Cardiovascular. Arteriosclerosis, 2005.
47. Schaap, F.G., et al., *ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 27941-7.
48. Levitan, I., S. Volkov, and P.V. Subbaiah, *Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(1): p. 39-75.

49. Sánchez-Quesada J.L., O.L.J., *Modificación y oxidación de las lipoproteínas*. Medicina Cardiovascular. Arteriosclerosis, 2005. **Tomo I**: p. 625-637.
50. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
51. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
52. Jessup, W. and L. Kritharides, *Metabolism of oxidized LDL by macrophages*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(5): p. 473-81.
53. Wang, M. and M.R. Briggs, *HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance*. Chem Rev, 2004. **104**(1): p. 119-37.
54. Tall, A.R., *Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins*. J Intern Med, 2008. **263**(3): p. 256-73.
55. von Eckardstein, A., J.R. Nofer, and G. Assmann, *High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 13-27.
56. Clay, M.A., et al., *Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins A-I and A-II is mediated by lecithin:cholesterol acyltransferase*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9019-25.
57. Rader, D.J., et al., *Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 321-30.
58. Kuivenhoven, J.A., et al., *A unique genetic and biochemical presentation of fish-eye disease*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2783-91.
59. Gómez-Coronado, D., *Salida celular y transporte reverso de colesterol*. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 2010. **22**(supl 1): p. 12-16.
60. Rader, D.J., *Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies*. J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3090-100.
61. Garg, A. and V. Simha, *Update on dyslipidemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(5): p. 1581-9.
62. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia*. Annu Rev Genet, 1979. **13**: p. 259-89.
63. Hansen, P.S., *Familial defective apolipoprotein B-100*. Dan Med Bull, 1998. **45**(4): p. 370-82.
64. Maxfield, F.R. and G. van Meer, *Cholesterol, the central lipid of mammalian cells*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(4): p. 422-9.
65. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 154-6.
66. Sirtori, C.R., et al., *Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study*. Circulation, 2001. **103**(15): p. 1949-54.
67. Rust, S., et al., *Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 352-5.
68. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 347-51.
69. Brooks-Wilson, A., et al., *Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 336-45.
70. Yvan-Charvet, L., N. Wang, and A.R. Tall, *Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 139-43.

71. Levy, E., *The genetic basis of primary disorders of intestinal fat transport*. Clin Invest Med, 1996. **19**(5): p. 317-24.
72. Jones, B., et al., *Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 29-31.
73. Rudenko, G., et al., *Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH*. Science, 2002. **298**(5602): p. 2353-8.
74. Costet, P., et al., *Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6211-8.
75. Jeong, H.J., et al., *Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2*. J Lipid Res, 2008. **49**(2): p. 399-409.
76. Tontonoz, P., *Transcriptional and Posttranscriptional Control of Cholesterol Homeostasis by Liver X Receptors*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 129-37.
77. Wade, D.P., B.L. Knight, and A.K. Soutar, *Regulation of low-density-lipoprotein-receptor mRNA by insulin in human hepatoma Hep G2 cells*. Eur J Biochem, 1989. **181**(3): p. 727-31.
78. Cooper, A.D., R. Nutik, and J. Chen, *Characterization of the estrogen-induced lipoprotein receptor of rat liver*. J Lipid Res, 1987. **28**(1): p. 59-68.
79. Ma, P.T., et al., *Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 alpha-ethinyl estradiol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(3): p. 792-6.
80. Kumar, A., et al., *Phorbol ester-induced low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 cells involves protein kinase C-mediated p42/44 MAP kinase activation*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2240-8.
81. Hamanaka, R., et al., *Induction of low density lipoprotein receptor and a transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human microvascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13160-5.
82. Moorby, C.D., et al., *Transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta stimulate LDL receptor activity in Hep G2 cells*. Atherosclerosis, 1992. **97**(1): p. 21-8.
83. Basheeruddin, K., et al., *Platelet-derived growth factor enhances Sp1 binding to the LDL receptor gene*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(8): p. 1248-54.
84. Dehouck, B., et al., *A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier*. J Cell Biol, 1997. **138**(4): p. 877-89.
85. Hussain, M.M., D.K. Strickland, and A. Bakillah, *The mammalian low-density lipoprotein receptor family*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 141-72.
86. Hammad, S.M., et al., *Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12003-8.
87. Herz, J., *The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain*. Neuron, 2001. **29**(3): p. 571-81.
88. Obunike, J.C., et al., *Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8934-41.
89. Hoekstra, M., T.J. Van Berkel, and M. Van Eck, *Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(47): p. 5916-24.
90. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Scavenger cell receptor shared*. Nature, 1985. **316**(6030): p. 680-1.
91. Haworth, R., et al., *The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1431-9.
92. Ishiguro, T., et al., *Role of macrophage scavenger receptors in response to Listeria monocytogenes infection in mice*. Am J Pathol, 2001. **158**(1): p. 179-88.

93. Tandon, N.N., et al., *Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36)*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7570-5.
94. Yamashita, S., et al., *Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients*. Mol Cell Biochem, 2007. **299**(1-2): p. 19-22.
95. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
96. Nozaki, S., et al., *Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1859-65.
97. Nakagawa, T., et al., *Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(8): p. 1350-7.
98. Nagy, L., et al., *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*. Cell, 1998. **93**(2): p. 229-40.
99. Calvo, D., et al., *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. J Lipid Res, 1998. **39**(4): p. 777-88.
100. Calvo, D., et al., *CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2341-9.
101. Babbitt, J., et al., *Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13242-9.
102. Jian, B., et al., *Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5599-606.
103. Ji, Y., et al., *Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20982-5.
104. Brundert, M., et al., *Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 143-8.
105. Out, R., et al., *Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice*. J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 2088-95.
106. Zhang, Y., et al., *Regulation of SR-BI-mediated selective lipid uptake in Chinese hamster ovary-derived cells by protein kinase signaling pathways*. J Lipid Res, 2007. **48**(2): p. 405-16.
107. Kozarsky, K.F., et al., *Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 414-7.
108. Ueda, Y., et al., *Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7165-71.
109. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 125-38.
110. Mesmin, B. and F.R. Maxfield, *Intracellular sterol dynamics*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(7): p. 636-45.
111. Liscum, L. and N.J. Munn, *Intracellular cholesterol transport*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1438**(1): p. 19-37.
112. Maxfield, F.R. and A.K. Menon, *Intracellular sterol transport and distribution*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(4): p. 379-85.
113. van Meer, G., *Lipids of the Golgi membrane*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(1): p. 29-33.

114. Blanchette-Mackie, E.J., *Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(1): p. 171-83.
115. Mukherjee, S., et al., *Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog*. Biophys J, 1998. **75**(4): p. 1915-25.
116. Wustner, D., et al., *Direct observation of rapid internalization and intracellular transport of sterol by macrophage foam cells*. Traffic, 2005. **6**(5): p. 396-412.
117. Mobius, W., et al., *Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway*. Traffic, 2003. **4**(4): p. 222-31.
118. Tarling, E.J. and P.A. Edwards, *ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(49): p. 19719-24.
119. Heino, S., et al., *Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8375-80.
120. Sullivan, D.P., et al., *Sterol trafficking between the endoplasmic reticulum and plasma membrane in yeast*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 356-8.
121. Zha, X., et al., *Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis*. J Cell Biol, 1998. **140**(1): p. 39-47.
122. Skiba, P.J., et al., *The distal pathway of lipoprotein-induced cholesterol esterification, but not sphingomyelinase-induced cholesterol esterification, is energy-dependent*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13392-400.
123. Okuda, K.I., *Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation*. J Lipid Res, 1994. **35**(3): p. 361-72.
124. Miller, W.L., *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(6): p. 663-76.
125. Kallen, C.B., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26285-8.
126. Arakane, F., et al., *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13731-6.
127. Bose, H.S., V.R. Lingappa, and W.L. Miller, *Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 87-91.
128. Alpy, F., et al., *The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4261-9.
129. Zhang, M., et al., *MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33300-10.
130. Alpy, F. and C. Tomasetto, *Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 13): p. 2791-801.
131. Peake, K.B. and J.E. Vance, *Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells*. FEBS Lett, 2010. **584**(13): p. 2731-9.
132. Higgins, M.E., et al., *Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network*. Mol Genet Metab, 1999. **68**(1): p. 1-13.
133. Neufeld, E.B., et al., *The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9627-35.
134. Carstea, E.D., et al., *Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis*. Science, 1997. **277**(5323): p. 228-31.

135. Karten, B., K.B. Peake, and J.E. Vance, *Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(7): p. 659-70.
136. Infante, R.E., et al., *Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1052-63.
137. Garver, W.S., et al., *The Niemann-Pick C1 gene is downregulated by feedback inhibition of the SREBP pathway in human fibroblasts*. J Lipid Res, 2008. **49**(5): p. 1090-102.
138. Gevry, N., et al., *Cholesterol supply and SREBPs modulate transcription of the Niemann-Pick C-1 gene in steroidogenic tissues*. J Lipid Res, 2008. **49**(5): p. 1024-33.
139. Naureckiene, S., et al., *Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease*. Science, 2000. **290**(5500): p. 2298-301.
140. Infante, R.E., et al., *NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15287-92.
141. Okamura, N., et al., *A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1438**(3): p. 377-87.
142. Infante, R.E., et al., *Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1064-75.
143. Xu, S., et al., *Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23525-31.
144. Liu, R., et al., *Characterization of fluorescent sterol binding to purified human NPC1*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1840-52.
145. Kwon, H.J., et al., *Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1213-24.
146. Azuma, Y., et al., *Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation*. Genes Cells, 2009. **14**(2): p. 191-204.
147. Ohgami, N., et al., *Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12473-8.
148. Frolov, A., et al., *NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25517-25.
149. Pagler, T.A., et al., *Cholesterol efflux via HDL resecretion occurs when cholesterol transport out of the lysosome is impaired*. J Lipid Res, 2007. **48**(10): p. 2141-50.
150. Urano, Y., et al., *Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16513-8.
151. Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick, *Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 11821-7.
152. Stein, M.P., J. Dong, and A. Wandinger-Ness, *Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(11): p. 1421-37.
153. Walter, M., J.P. Davies, and Y.A. Ioannou, *Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann-Pick C1 late endosomes*. J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 243-53.
154. Choudhury, A., et al., *Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells*. J Clin Invest, 2002. **109**(12): p. 1541-50.

155. Linder, M.D., et al., *Rab8 regulates ABCA1 cell surface expression and facilitates cholesterol efflux in primary human macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(6): p. 883-8.
156. Rader, D.J., et al., *The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S189-94.
157. Mendez, A.J., J.F. Oram, and E.L. Bierman, *Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(16): p. 10104-11.
158. Khera, A.V., et al., *Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(2): p. 127-35.
159. Canfran-Duque, A., et al., *Curcumin promotes exosomes/microvesicles secretion that attenuates lysosomal cholesterol traffic impairment*. *Mol Nutr Food Res*, 2013.
160. Baldan, A., D.D. Bojanic, and P.A. Edwards, *The ABCs of sterol transport*. *J Lipid Res*, 2009. **50 Suppl**: p. S80-5.
161. Hosie, A.H., et al., *Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake*. *Mol Microbiol*, 2001. **40**(6): p. 1449-59.
162. Oram, J.F. and R.M. Lawn, *ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(8): p. 1173-9.
163. Remaley, A.T., et al., *Synthetic amphipathic helical peptides promote lipid efflux from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(4): p. 828-36.
164. Wang, N., et al., *Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 33053-8.
165. Vedhachalam, C., et al., *ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(7): p. 1603-9.
166. Vedhachalam, C., et al., *Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(34): p. 25123-30.
167. Takahashi, Y. and J.D. Smith, *Cholesterol efflux to apolipoprotein A1 involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11358-63.
168. Neufeld, E.B., et al., *The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 15571-8.
169. Neufeld, E.B., et al., *Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(29): p. 27584-90.
170. Chen, W., et al., *Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(47): p. 43564-9.
171. Le Goff, W., et al., *Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(11): p. 2155-61.
172. Chen, W., N. Wang, and A.R. Tall, *A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(32): p. 29277-81.
173. Wang, N., et al., *A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(1): p. 99-107.
174. Martinez, L.O., et al., *Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37368-74.

175. Lu, R., et al., *ApoA-I facilitates ABCA1 recycle/accumulation to cell surface by inhibiting its intracellular degradation and increases HDL generation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(10): p. 1820-4.
176. Faulkner, L.E., et al., *An analysis of the role of a retroendocytosis pathway in ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(6): p. 1322-32.
177. Denis, M., Y.D. Landry, and X. Zha, *ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(23): p. 16178-86.
178. Nagao, K., M. Tomioka, and K. Ueda, *Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization*. *Febs J*, 2011. **278**(18): p. 3190-203.
179. Chinetti, G., et al., *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. *Nat Med*, 2001. **7**(1): p. 53-8.
180. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. *Mol Cell*, 2001. **7**(1): p. 161-71.
181. Le Goff, W., et al., *Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(3): p. 527-33.
182. Rayner, K.J., et al., *MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis*. *Science*, 2010. **328**(5985): p. 1570-3.
183. Najafi-Shoushtari, S.H., et al., *MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis*. *Science*, 2010. **328**(5985): p. 1566-9.
184. Ramirez, C.M., et al., *MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2707-14.
185. Ramirez, C.M., et al., *Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144*. *Circ Res*, 2013. **112**(12): p. 1592-601.
186. Woodward, O.M., A. Kottgen, and M. Kottgen, *ABCG transporters and disease*. *Febs J*, 2011. **278**(18): p. 3215-25.
187. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain*. *Faseb J*, 2008. **22**(4): p. 1073-82.
188. Tarr, P.T. and P.A. Edwards, *ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(1): p. 169-82.
189. Oldfield, S., et al., *ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1591**(1-3): p. 175-9.
190. Schou, J., et al., *Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(2): p. 506-15.
191. Sankaranarayanan, S., et al., *Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(2): p. 275-84.
192. Gelissen, I.C., et al., *ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(3): p. 534-40.
193. Wang, N., et al., *LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(6): p. 1310-6.
194. Li, A.C., et al., *Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(11): p. 1564-76.

195. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
196. Larrede, S., et al., *Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1930-6.
197. Small, D.M., *Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 4-6.
198. Kobayashi, A., et al., *Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1*. J Lipid Res, 2006. **47**(8): p. 1791-802.
199. Sano, O., et al., *Sphingomyelin-dependence of cholesterol efflux mediated by ABCG1*. J Lipid Res, 2007. **48**(11): p. 2377-84.
200. Terasaka, N., et al., *High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(38): p. 15093-8.
201. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1771-5.
202. Graf, G.A., et al., *Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 659-69.
203. Yu, L., et al., *Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16237-42.
204. Yu, L., et al., *Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 671-80.
205. Rothblat, G.H. and M.C. Phillips, *High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport*. Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(3): p. 229-38.
206. Pagler, T.A., et al., *SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11193-204.
207. Chinetti, G., et al., *CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2411-7.
208. Gomez-Coronado, D., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in men and women from a Spanish population: allele frequencies and influence on plasma lipids and apolipoproteins*. Atherosclerosis, 1999. **147**(1): p. 167-76.
209. Zanotti, I., et al., *Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 74-80.
210. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. Science, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
211. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
212. Zhao, Y., et al., *A novel function of apolipoprotein E: upregulation of ATP-binding cassette transporter A1 expression*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21453.
213. Heeren, J., et al., *Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14370-8.
214. Heeren, J., et al., *Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55483-92.
215. Vedhachalam, C., et al., *The C-terminal lipid-binding domain of apolipoprotein E is a highly efficient mediator of ABCA1-dependent cholesterol efflux that promotes the assembly of high-density lipoproteins*. Biochemistry, 2007. **46**(10): p. 2583-93.

216. Escola-Gil, J.C., et al., *In vivo macrophage-specific RCT and antioxidant and antiinflammatory HDL activity measurements: New tools for predicting HDL atheroprotection*. Atherosclerosis, 2009. **206**(2): p. 321-7.
217. Eriksson, M., et al., *Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A-I. Potential reverse cholesterol transport in humans*. Circulation, 1999. **100**(6): p. 594-8.
218. Zhang, Y., et al., *Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo*. Circulation, 2003. **108**(6): p. 661-3.
219. Calpe-Berdiel, L., et al., *Direct evidence in vivo of impaired macrophage-specific reverse cholesterol transport in ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1738**(1-3): p. 6-9.
220. Mukhamedova, N., et al., *Enhancing apolipoprotein A-I-dependent cholesterol efflux elevates cholesterol export from macrophages in vivo*. J Lipid Res, 2008. **49**(11): p. 2312-22.
221. Wang, X., et al., *Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2216-24.
222. Rotllan, N., et al., *Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. e128-32.
223. Martel, C., et al., *Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice*. J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1571-9.
224. Lim, H.Y., et al., *Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 671-84.
225. Rigotti, A., et al., *A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12610-5.
226. Arai, T., et al., *Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2366-71.
227. Zhang, Y., et al., *Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2870-4.
228. Vergeer, M., et al., *Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans*. N Engl J Med, 2011. **364**(2): p. 136-45.
229. Brunham, L.R., et al., *Novel mutations in scavenger receptor BI associated with high HDL cholesterol in humans*. Clin Genet, 2011. **79**(6): p. 575-81.
230. Schwartz, C.C., J.M. VandenBroek, and P.S. Cooper, *Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans*. J Lipid Res, 2004. **45**(9): p. 1594-607.
231. Martinez, L.O., et al., *Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis*. Nature, 2003. **421**(6918): p. 75-9.
232. Jacquet, S., et al., *The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(21): p. 2508-15.
233. Calpe-Berdiel, L., et al., *Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1904-11.
234. Kusters, A., et al., *Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice*. J Hepatol, 2003. **38**(6): p. 710-6.
235. van der Velde, A.E., et al., *Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice*. Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 967-75.

236. van der Velde, A.E., G. Brufau, and A.K. Groen, *Transintestinal cholesterol efflux*. Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(3): p. 167-71.
237. Temel, R.E. and J.M. Brown, *Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(2): p. 85-90.
238. Glomset, J.A., *The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction*. J Lipid Res, 1968. **9**(2): p. 155-67.
239. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. Cell, 1997. **89**(3): p. 331-40.
240. Zelcer, N. and P. Tontonoz, *Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 607-14.
241. Fernandez-Hernando, C., et al., *MicroRNAs in lipid metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2011. **22**(2): p. 86-92.
242. Sakai, J., et al., *Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 20213-21.
243. Hua, X., et al., *Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein*. Cell, 1996. **87**(3): p. 415-26.
244. Nohturfft, A., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 12848-53.
245. Adams, C.M., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10647-52.
246. Adams, C.M., et al., *Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52772-80.
247. Feramisco, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8487-96.
248. Yabe, D., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12753-8.
249. Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown, *Protein sensors for membrane sterols*. Cell, 2006. **124**(1): p. 35-46.
250. Nohturfft, A., et al., *Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes*. Cell, 2000. **102**(3): p. 315-23.
251. Espenshade, P.J., et al., *Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22795-804.
252. Sun, L.P., et al., *Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26483-90.
253. Antonny, B. and R. Schekman, *ER export: public transportation by the COPII coach*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(4): p. 438-43.
254. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
255. Edwards, P.A. and J. Ericsson, *Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 157-85.
256. Sato, R., et al., *Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24714-20.

257. Llorente-Cortes, V., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription*. J Mol Biol, 2006. **359**(4): p. 950-60.
258. Bist, A., P.E. Fielding, and C.J. Fielding, *Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10693-8.
259. Gong, Y., et al., *Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake*. Cell Metab, 2006. **3**(1): p. 15-24.
260. Radhakrishnan, A., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6511-8.
261. Sever, N., et al., *Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 25-33.
262. Roitelman, J., et al., *Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1992. **117**(5): p. 959-73.
263. Sever, N., et al., *Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52479-90.
264. Liscum, L., et al., *Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1985. **260**(1): p. 522-30.
265. Gil, G., et al., *Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme*. Cell, 1985. **41**(1): p. 249-58.
266. Song, B.L., N.B. Javitt, and R.A. DeBose-Boyd, *Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 179-89.
267. Jo, Y. and R.A. Debose-Boyd, *Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(3): p. 185-98.
268. DeBose-Boyd, R.A., *Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase*. Cell Res, 2008. **18**(6): p. 609-21.
269. Yang, C., et al., *Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands*. J Biol Chem, 2006. **281**(38): p. 27816-26.
270. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 459-81.
271. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
272. Laffitte, B.A., et al., *Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(22): p. 7558-68.
273. Whitney, K.D., et al., *Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRA gene in human macrophages*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43509-15.
274. Zhao, C. and K. Dahlman-Wright, *Liver X receptor in cholesterol metabolism*. J Endocrinol, 2010. **204**(3): p. 233-40.
275. Wang, Y., et al., *Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRA*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26332-9.
276. Zelcer, N., et al., *LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor*. Science, 2009. **325**(5936): p. 100-4.
277. Hong, C., et al., *The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2*. J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 19720-6.

278. Scotti, E., et al., *Targeted disruption of the idol gene alters cellular regulation of the low-density lipoprotein receptor by sterols and liver x receptor agonists*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(9): p. 1885-93.
279. Cohen, J.C., et al., *Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease*. N Engl J Med, 2006. **354**(12): p. 1264-72.
280. Laffitte, B.A., et al., *LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 507-12.
281. Venkateswaran, A., et al., *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12097-102.
282. Venkateswaran, A., et al., *Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14700-7.
283. Repa, J.J., et al., *Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18793-800.
284. Lu, T.T., et al., *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 507-15.
285. Escola-Gil, J.C., et al., *The Cholesterol Content of Western Diets Plays a Major Role in the Paradoxical Increase in High-Density Lipoprotein Cholesterol and Upregulates the Macrophage Reverse Cholesterol Transport Pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(11): p. 2493-9.
286. Bensinger, S.J., et al., *LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response*. Cell, 2008. **134**(1): p. 97-111.
287. Yvan-Charvet, L., et al., *ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1689-93.
288. Mak, P.A., et al., *Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31900-8.
289. Hummasti, S., et al., *Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target*. J Lipid Res, 2004. **45**(4): p. 616-25.
290. Liang, Y., et al., *Liver X receptors (LXRs) regulate apolipoprotein AIV-implications of the antiatherosclerotic effect of LXR agonists*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(8): p. 2000-10.
291. Jakel, H., et al., *The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45462-9.
292. Pennacchio, L.A., et al., *An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing*. Science, 2001. **294**(5540): p. 169-73.
293. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
294. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Cell, 1998. **93**(5): p. 693-704.
295. Chiang, J.Y., R. Kimmel, and D. Stroup, *Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha)*. Gene, 2001. **262**(1-2): p. 257-65.
296. Alberti, S., et al., *Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 565-73.
297. Barbier, O., et al., *Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation*. Mol Cell Biochem, 2009. **326**(1-2): p. 3-8.
298. Marx, N., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells*. Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1168-78.
299. Gómez-Coronado D, L.M., *Influencia de los activadores de PPAR sobre el metabolismo lipídico*. Cardiovascular Risk Factors, 2005. **14**: p. 297-308.

300. Chakravarthy, M.V., et al., *Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver*. Cell, 2009. **138**(3): p. 476-88.
301. Prossnitz, E.R. and M. Barton, *The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(12): p. 715-26.
302. Li, T. and J.Y. Chiang, *Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs*. PPAR Res, 2009. **2009**: p. 501739.
303. Iida, K.T., et al., *PPAR gamma ligands, troglitazone and pioglitazone, up-regulate expression of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase gene in THP-1 macrophages*. FEBS Lett, 2002. **520**(1-3): p. 177-81.
304. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
305. Lanford, R.E., et al., *Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection*. Science, 2010. **327**(5962): p. 198-201.
306. Esau, C., et al., *miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting*. Cell Metab, 2006. **3**(2): p. 87-98.
307. Iliopoulos, D., et al., *MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism*. J Lipid Res, 2010. **51**(6): p. 1513-23.
308. Gerin, I., et al., *Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(2): p. E198-206.
309. Esau, C., et al., *MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52361-5.
310. Lin, Q., et al., *A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis*. Febs J, 2009. **276**(8): p. 2348-58.
311. Nakanishi, N., et al., *The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385**(4): p. 492-6.
312. Marquart, T.J., et al., *miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12228-32.
313. Wang, M.D., et al., *Differential regulation of ATP binding cassette protein A1 expression and ApoA-I lipidation by Niemann-Pick type C1 in murine hepatocytes and macrophages*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22525-33.
314. Rayner, K.J., et al., *Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2921-31.
315. Gerin, I., et al., *Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation*. J Biol Chem, 2010. **285**(44): p. 33652-61.
316. Badimon, L., G. Vilahur, and T. Padro, *Lipoproteins, platelets and atherothrombosis*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(10): p. 1161-78.
317. Shibata, N. and C.K. Glass, *Macrophages, oxysterols and atherosclerosis*. Circ J, 2010. **74**(10): p. 2045-51.
318. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
319. Tabas, I., *Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 164-74.
320. Leonarduzzi, G., B. Sottero, and G. Poli, *Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review)*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(12): p. 700-710.
321. Osborne, C.K., H. Zhao, and S.A. Fuqua, *Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use*. J Clin Oncol, 2000. **18**(17): p. 3172-86.
322. Pickar, J.H., T. MacNeil, and K. Ohlth, *SERMs: progress and future perspectives*. Maturitas, 2010. **67**(2): p. 129-38.

- 323. Ali, S., L. Buluwela, and R.C. Coombes, *Antiestrogens and their therapeutic applications in breast cancer and other diseases*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 217-32.
- 324. Stearns, V. and J.M. Rae, *Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response?* Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e34.
- 325. Gundimeda, U., Z.H. Chen, and R. Gopalakrishna, *Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13504-14.
- 326. Matsuoka, H., et al., *Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways*. Exp Cell Res, 2009. **315**(12): p. 2022-32.
- 327. Jordan, V.C., *SERMs: meeting the promise of multifunctional medicines*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(5): p. 350-6.
- 328. Banerjee, S., et al., *Comparative effects of anastrozole, tamoxifen alone and in combination on plasma lipids and bone-derived resorption during neoadjuvant therapy in the impact trial*. Ann Oncol, 2005. **16**(10): p. 1632-8.
- 329. Grainger, D.J., C.M. Witchell, and J.C. Metcalfe, *Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1067-73.
- 330. Grainger, D.J. and P.M. Schofield, *Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence*. Circulation, 2005. **112**(19): p. 3018-24.
- 331. Gylling, H., et al., *Tamoxifen and toremifene lower serum cholesterol by inhibition of delta 8-cholesterol conversion to lathosterol in women with breast cancer*. J Clin Oncol, 1995. **13**(12): p. 2900-5.
- 332. Cho, S.Y., J.H. Kim, and Y.K. Paik, *Cholesterol biosynthesis from lanosterol: differential inhibition of sterol delta 8-isomerase and other lanosterol-converting enzymes by tamoxifen*. Mol Cells, 1998. **8**(2): p. 233-9.
- 333. Kedjouar, B., et al., *Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 34048-61.
- 334. Suarez, Y., et al., *Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 346-55.
- 335. Danel, L., et al., *Distribution of androgen and estrogen receptors among lymphoid and haemopoietic cell lines*. Leuk Res, 1985. **9**(11): p. 1373-8.
- 336. Bruning, J.C., et al., *Estrogen receptor-alpha and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **86**(2): p. 113-21.
- 337. Dong, P., et al., *Induction of macrophage scavenger receptor type BI expression by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen*. Atherosclerosis, 2011. **218**(2): p. 435-42.
- 338. de Medina, P., et al., *Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 1165-73.
- 339. Lelliott, C.J., et al., *Transcript and metabolite analysis of the effects of tamoxifen in rat liver reveals inhibition of fatty acid synthesis in the presence of hepatic steatosis*. FASEB J, 2005. **19**(9): p. 1108-19.
- 340. Gudbrandsen, O.A., T.H. Rost, and R.K. Berge, *Causes and prevention of tamoxifen-induced accumulation of triacylglycerol in rat liver*. J Lipid Res, 2006. **47**(10): p. 2223-32.
- 341. Hozumi, Y., M. Kawano, and M. Miyata, *Severe hypertriglyceridemia caused by tamoxifen-treatment after breast cancer surgery*. Endocr J, 1997. **44**(5): p. 745-9.
- 342. Johnston, S.R., *Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: selective oestrogen receptor modulators and downregulators for breast cancer - have they lost their way?* Breast Cancer Res, 2005. **7**(3): p. 119-30.
- 343. Harvey, H.A., M. Kimura, and A. Hajba, *Toremifene: an evaluation of its safety profile*. Breast, 2006. **15**(2): p. 142-57.

344. Price, D., et al., *Toremifene for the prevention of prostate cancer in men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia: results of a double-blind, placebo controlled, phase IIB clinical trial*. J Urol, 2006. **176**(3): p. 965-70; discussion 970-1.
345. Saylor, P.J. and M.R. Smith, *Bone health and prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010. **13**(1): p. 20-7.
346. Adler, R.A., *Management of osteoporosis in men on androgen deprivation therapy*. Maturitas, 2011. **68**(2): p. 143-7.
347. DeMichele, A., et al., *Impact of raloxifene or tamoxifen use on endometrial cancer risk: a population-based case-control study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4151-9.
348. Tominaga, T., et al., *Effects of toremifene and tamoxifen on lipid profiles in post-menopausal patients with early breast cancer: interim results from a Japanese phase III trial*. Jpn J Clin Oncol, 2010. **40**(7): p. 627-33.
349. Thiebaud, D. and R.J. Secest, *Selective estrogen receptor modulators: mechanism of action and clinical experience. Focus on raloxifene*. Reprod Fertil Dev, 2001. **13**(4): p. 331-6.
350. Arevalo, M.A., et al., *Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents*. J Mol Endocrinol, 2011. **46**(1): p. R1-9.
351. Burkard, I., et al., *Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers*. Atherosclerosis, 2007. **194**(1): p. 71-8.
352. Duane, W.C. and N.B. Javitt, *27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects*. J Lipid Res, 1999. **40**(7): p. 1194-9.
353. Umetani, M. and P.W. Shaul, *27-Hydroxycholesterol: the first identified endogenous SERM*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(4): p. 130-5.
354. Umetani, M., et al., *27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1185-92.
355. DuSell, C.D., et al., *27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(1): p. 65-77.
356. DuSell, C.D., et al., *The endogenous selective estrogen receptor modulator 27-hydroxycholesterol is a negative regulator of bone homeostasis*. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 3675-85.
357. Kumar, V., et al., *Functional domains of the human estrogen receptor*. Cell, 1987. **51**(6): p. 941-51.
358. Regitz-Zagrosek, V., T.M. Wintermantel, and C. Schubert, *Estrogens and SERMs in coronary heart disease*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(2): p. 130-9.
359. Cowley, S.M. and M.G. Parker, *A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **69**(1-6): p. 165-75.
360. Webb, P., et al., *Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 443-56.
361. Paech, K., et al., *Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1508-10.
362. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
363. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
364. Uto-Kondo, H., et al., *Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages*. Circ Res, 2010. **106**(4): p. 779-87.
365. de Almeida, M.C., et al., *A simple method for human peripheral blood monocyte isolation*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000. **95**(2): p. 221-3.
366. Brown, M.S., S.E. Dana, and J.L. Goldstein, *Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a*

- normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.* J Biol Chem, 1974. **249**(3): p. 789-96.
367. Rodriguez-Acebes, S., et al., *Dose-dependent dual effects of cholesterol and desmosterol on J774 macrophage proliferation.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 484-8.
368. Basu, S.K., et al., *Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(9): p. 3178-82.
369. Klein, U., G. Gimpl, and F. Fahrenholz, *Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor.* Biochemistry, 1995. **34**(42): p. 13784-93.
370. Brown, A.J., et al., *Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism.* Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 237-45.
371. Saeed, A.I., et al., *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis.* Biotechniques, 2003. **34**(2): p. 374-8.
372. Escola-Gil, J.C., et al., *Hepatic lipase- and endothelial lipase-deficiency in mice promotes macrophage-to-feces RCT and HDL antioxidant properties.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(4): p. 691-7.
373. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
374. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
375. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.* J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
376. Chamorro, L., et al., *Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis.* Clin Chim Acta, 2013. **421**: p. 132-9.
377. Saphner, T., et al., *The association of nonalcoholic steatohepatitis and tamoxifen in patients with breast cancer.* Cancer, 2009. **115**(14): p. 3189-95.
378. Christian, A.E., et al., *Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content.* J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2264-72.
379. Abi-Mosleh, L., et al., *Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19316-21.
380. Kristiana, I., et al., *Antipsychotic drugs upregulate lipogenic gene expression by disrupting intracellular trafficking of lipoprotein-derived cholesterol.* Pharmacogenomics J, 2010. **10**(5): p. 396-407.
381. Loughheed, M., et al., *Uptake of oxidized LDL by macrophages differs from that of acetyl LDL and leads to expansion of an acidic endolysosomal compartment.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(8): p. 1881-90.
382. Wang, M.D., et al., *Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways.* J Lipid Res, 2007. **48**(3): p. 633-45.
383. Kalaany, N.Y. and D.J. Mangelsdorf, *LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism.* Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 159-91.
384. Huang, Y., A. von Eckardstein, and G. Assmann, *Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma.* Arterioscler Thromb, 1993. **13**(3): p. 445-58.
385. Hoang, A., et al., *Mechanism of cholesterol efflux in humans after infusion of reconstituted high-density lipoprotein.* Eur Heart J, 2012. **33**(5): p. 657-65.

386. Mendez-Gonzalez, J., et al., *Disodium ascorbyl phytostanol phosphate (FM-VP4), a modified phytostanol, is a highly active hypocholesterolaemic agent that affects the enterohepatic circulation of both cholesterol and bile acids in mice*. Br J Nutr, 2010. **103**(2): p. 153-60.
387. Graf, G.A., et al., *ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48275-82.
388. Hamada, N., et al., *Toremifene-induced fatty liver and NASH in breast cancer patients with breast-conservation treatment*. Int J Oncol, 2000. **17**(6): p. 1119-23.
389. Matsumura, M., et al., *[A case of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) aggravated after treatment with raloxifene]*. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2011. **108**(12): p. 2036-41.
390. Koshizuka, K., et al., *[Tamoxifen-induced severe hypertriglyceridemia--report of 3 cases]*. Gan To Kagaku Ryoho, 2004. **31**(7): p. 1109-12.
391. Insull, W., Jr., et al., *Effects of raloxifene and low-dose simvastatin coadministration on plasma lipids in postmenopausal women with primary hypercholesterolemia*. Metabolism, 2005. **54**(7): p. 939-46.
392. Bowden, K.L., et al., *Lysosomal acid lipase deficiency impairs regulation of ABCA1 gene and formation of high density lipoproteins in cholesteryl ester storage disease*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30624-35.
393. de Medina, P., et al., *Importance of cholesterol and oxysterols metabolism in the pharmacology of tamoxifen and other AEBS ligands*. Chem Phys Lipids, 2011. **164**(6): p. 432-7.
394. de Medina, P., et al., *Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(30): p. 13520-5.
395. Silvente-Poirot, S. and M. Poirot, *Cholesterol epoxide hydrolase and cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(6): p. 696-703.
396. Berrodin, T.J., et al., *Identification of 5alpha, 6alpha-epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(6): p. 1046-58.
397. Liscum, L. and J.R. Faust, *The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one*. J Biol Chem, 1989. **264**(20): p. 11796-806.
398. Shoemaker, C.J., et al., *Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann-Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56265.
399. Canfran-Duque, A., et al., *Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro*. J Lipid Res, 2013. **54**(2): p. 310-24.
400. Sanchez-Wandelmer, J., et al., *Haloperidol disrupts lipid rafts and impairs insulin signaling in SH-SY5Y cells*. Neuroscience, 2010. **167**(1): p. 143-53.
401. Goldman, S.D., et al., *Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes*. Bioanalysis, 2009. **1**(8): p. 1445-59.
402. Andrew, C.L., A.R. Klemm, and J.B. Lloyd, *Lysosome membrane permeability to amines*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1330**(1): p. 71-82.
403. Liscum, L., R.M. Ruggiero, and J.R. Faust, *The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts*. J Cell Biol, 1989. **108**(5): p. 1625-36.
404. Xie, C., et al., *Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(12): p. 1106-17.
405. Choi, H.Y., et al., *Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32569-77.
406. Rigamonti, E., et al., *Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages*. Circ Res, 2005. **97**(7): p. 682-9.

- 407. Boadu, E., et al., *Correction of apolipoprotein A-I-mediated lipid efflux and high density lipoprotein particle formation in human Niemann-Pick type C disease fibroblasts*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 37081-90.
- 408. Napolitano, M., et al., *17beta-estradiol enhances the flux of cholesterol through the cholesteryl ester cycle in human macrophages*. Biosci Rep, 2001. **21**(5): p. 637-52.
- 409. Badeau, R.M., et al., *Human macrophage cholesterol efflux potential is enhanced by HDL-associated 17beta-estradiol fatty acyl esters*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **116**(1-2): p. 44-9.
- 410. Reckless, J., J.C. Metcalfe, and D.J. Grainger, *Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice*. Circulation, 1997. **95**(6): p. 1542-8.
- 411. Lemieux, C., et al., *Hypolipidemic action of the SERM acolbifene is associated with decreased liver MTP and increased SR-BI and LDL receptors*. J Lipid Res, 2005. **46**(6): p. 1285-94.
- 412. Clarke, S.C., et al., *Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1497-502.
- 413. Parini, P., B. Angelin, and M. Rudling, *Importance of estrogen receptors in hepatic LDL receptor regulation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(9): p. 1800-5.
- 414. Zanotti, I., et al., *The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential*. J Lipid Res, 2008. **49**(5): p. 954-60.
- 415. Yu, L., et al., *Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15565-70.
- 416. Naik, S.U., et al., *Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo*. Circulation, 2006. **113**(1): p. 90-7.
- 417. Tamehiro, N., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21090-9.
- 418. Joseph, S.B., et al., *Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7604-9.
- 419. Havekes, L.M., E.C. de Wit, and H.M. Princen, *Cellular free cholesterol in Hep G2 cells is only partially available for down-regulation of low-density-lipoprotein receptor activity*. Biochem J, 1987. **247**(3): p. 739-46.
- 420. Havekes, L.M., et al., *Regulation of low density lipoprotein receptor activity in primary cultures of human hepatocytes by serum lipoproteins*. Hepatology, 1986. **6**(6): p. 1356-60.
- 421. Sniderman, A.D., et al., *Hepatic cholesterol homeostasis: is the low-density lipoprotein pathway a regulatory or a shunt pathway?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(11): p. 2481-90.
- 422. Duan, L.P., H.H. Wang, and D.Q. Wang, *Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice*. J Lipid Res, 2004. **45**(7): p. 1312-23.
- 423. Srivastava, R.A., *Estrogen-induced regulation of the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in mice: a possible mechanism of atheroprotection by estrogen*. Mol Cell Biochem, 2002. **240**(1-2): p. 67-73.
- 424. Stangl, H., et al., *Effect of estrogen on scavenger receptor BI expression in the rat*. J Endocrinol, 2002. **175**(3): p. 663-72.
- 425. Hewitt, K.N., et al., *The aromatase knockout mouse presents with a sexually dimorphic disruption to cholesterol homeostasis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3895-903.

426. Lewis, S., *Do endocrine treatments for breast cancer have a negative impact on lipid profiles and cardiovascular risk in postmenopausal women?* Am Heart J, 2007. **153**(2): p. 182-8.